



Approche physiopathologique et recherche de biomarqueurs associés aux complications neurovasculaires chez l'enfant drépanocytaire

Manoëlle Guillemin Kossorotoff

► To cite this version:

Manoëlle Guillemin Kossorotoff. Approche physiopathologique et recherche de biomarqueurs associés aux complications neurovasculaires chez l'enfant drépanocytaire. Neurosciences [q-bio.NC]. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P624 . tel-01138455

HAL Id: tel-01138455

<https://theses.hal.science/tel-01138455>

Submitted on 2 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET
BIOLOGIQUES

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Discipline : Neurosciences

Ecole Doctorale : Médicament Toxicologie Chimie Imageries

Présentée et soutenue publiquement

Par Manoëlle GUILLEMIN épouse KOSSOROTOFF

Le 24 novembre 2014

**Approche physiopathologique et recherche de biomarqueurs
associés aux complications neurovasculaires chez l'enfant
drépanocytaire**

JURY :

Mr le Professeur Philippe CONNES

Rapporteur

Mr le Professeur Philippe NGUYEN

Rapporteur

Mr le Docteur Jean-Benoît ARLET

Examineur

Mr le Docteur Pablo BARTOLUCCI

Examineur

Mr le Docteur Stéphane CHABRIER

Examineur

Mme le Professeur Pascale GAUSSEM

Directeur de thèse

Mme le Professeur Mariane de MONTALEMBERT

Co-Directeur de thèse

Mes remerciements les plus sincères

A Pascale Gaussem, qui a dirigé ce travail avec dynamisme, rigueur et patience. Merci pour ta curiosité et ton ouverture d'esprit à des disciplines non biologiques et pour ta bonne humeur et ton optimisme inaltérables (souvent admirés !). Ces qualités d'encadrement ont fait de cette thèse un plaisir, malgré les inévitables cahots de la recherche.

A Mariane de Montalembert, à l'origine de ce projet. Merci d'avoir partagé ton expérience et ton dynamisme. **A Valentine Brousse**, pour tes analyses toujours judicieuses. Merci à toutes deux de votre accueil au sein de l'équipe drépanocytose, de cette collaboration médicale et scientifique enrichissante, des projets que nous avons pu mettre en place et de ce que vous apportez chaque jour aux patients.

Aux cliniciens et biologistes des différentes spécialités, avec qui j'ai collaboré pour ce travail multidisciplinaire et aux membres de leurs équipes, en particulier Dominique Lasne (hémostasie), Damien Bonnet (cardiopédiatrie), David Grévent (radiopédiatrie), Thomas Blauwblomme (neurochirurgie), Olivier Naggara (neuroradiologie interventionnelle), Emmanuel Curis (biostatistiques), Chris Ottolenghi (biochimie), etc. Ces échanges transversaux, ces confrontations de points de vue différents ont été riches et essentiels pour permettre d'envisager les problématiques de manière globale.

Aux rapporteurs de ma thèse et aux membres du jury. Merci d'avoir accepté de consacrer une partie de votre temps pour lire et discuter ce travail, de manière constructive. Votre parcours scientifique et votre expérience des différents domaines abordés dans cette thèse sont pour moi un exemple et une motivation pour continuer à essayer de faire avancer les connaissances et améliorer la prise en charge des patients.

Aux soignants et aux techniciens de laboratoire, sans qui ce travail n'aurait pas été possible et qui contribuent au quotidien à la qualité de la prise en charge de ces enfants. Merci de votre implication et de votre gentillesse.

Aux familles et aux enfants malades, au contact desquels la motivation du métier de médecin se renouvelle au quotidien.

A l'Inserm et à Isabelle Desguerre, ma chef de service, car sans temps dédié et sans financement, ce travail de recherche n'aurait pu avoir lieu.

A mon mari et à mes enfants, pour leur bonne humeur, leur patience et leur bienveillance vis-à-vis de mes choix (et devoirs) professionnels.

RESUME

Approche physiopathologique et recherche de biomarqueurs associés aux complications neurovasculaires chez l'enfant drépanocytaire

L'atteinte vasculaire cérébrale est une complication grave et fréquente chez les enfants drépanocytaires, car elle impacte leur pronostic, en termes de morbidité (handicap) et de mortalité. L'accélération des vitesses mesurées par le doppler transcrânien (DTC) est prédictive du risque d'infarctus cérébral et implique une modification de la prise en charge thérapeutique. Chez l'enfant drépanocytaire, l'infarctus cérébral est d'origine multifactorielle, lié à la vasculopathie cérébrale sténotique ainsi qu'à une hypercoagulabilité et une activation cellulaire.

Nous avons étudié de manière prospective l'association de marqueurs biologiques au DTC chez 108 enfants porteurs de syndrome drépanocytaire majeur et recherché des éléments prédictifs d'événement vasculaire périphérique ou cérébral. Nous avons ainsi réalisé une analyse approfondie de la fonction endothéliale, de l'activation de l'hémostase primaire et de la coagulation, de l'activation cellulaire et de la mécanique artérielle. L'atteinte vasculaire cérébrale a été estimée en considérant les données du DTC comme une variable continue plutôt que catégorielle. Le principal résultat est le rôle prédictif du nombre des cellules souches hématopoïétiques CD34+ pour la survenue d'événements cliniques vasculaires.

Nous avons également mis en évidence un profil particulier de coagulation chez les enfants drépanocytaires présentant des céphalées récurrentes ou des accès migraineux. Ceci supporte l'hypothèse que les céphalées chez l'enfant drépanocytaire, et notamment celles répondant aux critères de la migraine, peuvent être le reflet d'événements ischémiques cérébraux ultra-transitoires. Elles représentent donc peut-être un indicateur indirect de risque ischémique cérébral.

Nous avons par ailleurs montré que le risque hémorragique cérébral chez les enfants drépanocytaires restait proportionnellement stable par rapport au risque ischémique, malgré l'utilisation en routine de stratégies de prévention du risque ischémique. L'observation de lésions sténotiques et d'anévrismes permet de supposer que ces atteintes vasculaires cérébrales procèdent de mécanismes physiopathologiques communs.

L'amélioration de la compréhension des mécanismes physiopathologiques des complications neurovasculaires et la mise en évidence de facteurs prédictifs

d'événements cliniques est un pas supplémentaire vers l'amélioration de la sensibilité diagnostique de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire, de la compréhension des mécanismes des accidents vasculaires cérébraux de ces enfants et probablement de leur pronostic neurologique en permettant une prise en charge thérapeutique adaptée plus précoce.

Mots-clés : drépanocytose, enfant, vasculopathie cérébrale, AVC, infarctus cérébral, cellules souches hématopoïétiques, migraine, hémorragie cérébrale, anévrisme.

Table des matières

Introduction	8
A.Bibliographie	10
I.La vasculopathie cérébrale chez l'enfant drépanocytaire : caractérisation, dépistage, prise en charge (<i>aspects cliniques et radiologiques</i>)	10
1. Le Doppler transcrânien (DTC)	23
2. Anato-mo-pathologie de la vasculopathie drépanocytaire, corrélats radiologiques et lien avec les autres atteintes vasculaires d'organes	27
3. Le traitement par hydroxyurée / hydroxycarbamide	34
II. La vasculopathie cérébrale drépanocytaire : composants physiopathologiques, éléments biologiques et de mécanique artérielle associés	36
1. Hémolyse chronique et ses conséquences hémodynamiques : le retentissement artériel (anatomique et fonctionnel)	36
2. Profil de coagulation des adultes d'origine africaine	41
3. Profil prothrombotique et d'activation cellulaire chez l'adulte drépanocytaire et lien avec les accidents vasculaires cérébraux	42
4.Profil de coagulation et d'activation cellulaire en crise vaso-occlusive	51
5. Données disponibles chez l'enfant	52
B.Travail personnel	61
I.Recherche de marqueurs biologiques ou mécaniques liés au Doppler Transcrânien et étude de leur valeur prédictive sur la survenue d'événements vasculaires dans une population d'enfants drépanocytaires : étude DYVA	63
1. Objectifs	63
2. Méthode	64
3. Résultats	79
4. Discussion, perspectives	108
II.Les céphalées chez l'enfant drépanocytaire : un reflet de la vasculopathie cérébrale ?	112
1. Contexte et objectifs	112
2. Méthode	117
3. Résultats	118
4. Discussion, perspectives	122
III.Anévrysmes intracrâniens et vasculopathie cérébrale drépanocytaire	126
1. Contexte et Objectifs	126
2. Méthode	130
3. Résultats	131
4. Discussion, perspectives	139
C.Conclusions générales, perspectives de recherche ultérieures	145
Références	151

LISTE DES ABREVIATIONS

CVO : crise vaso-occlusive

CEC : cellules endothéliales circulantes

DTC : doppler transcrânien

EPC : endothelial progenitor cells, i.e. cellules progénitrices endothéliales

FVIII : facteur VIII

Hb : hémoglobine

HTAP : hypertension artérielle pulmonaire

MP : microparticules

NO : monoxyde d'azote

STA : syndrome thoracique aigu

VWF : facteur Willebrand

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Probabilité de survie sans infarctus cérébral selon la catégorie du DTC

Figure 2 : Mesure automatisée de la TAMMV, avec moyennage dans le temps de la vitesse maximale

Figure 3 : Vasculopathie cérébrale drépanocytaire : coupe histologique d'une grosse artère cérébrale

Figure 4 : Modèle proposé pour la progression des lésions des microvaisseaux pulmonaires dans la drépanocytose.

Figure 5 : Imagerie vasculaire échographique et calcul de l'épaisseur intima-media

Figure 6 : Mécanismes de détachement des cellules endothéliales

Figure 7 : Déroulement de l'étude DYVA avec ses 2 phases

Figure 8 : Principe de fonctionnement du thromboélastogramme

Figure 9 : Paramètres de génération de thrombine obtenus à partir du TEG®

Figure 10 : Conséquences cérébrales de la circulation de micro-thrombi

Figure 11 : Schéma physiopathologique de l'aura migraineuse et facteurs déclenchants de la vague de dépression corticale

Figure 12 : Répartition des AVC chez le drépanocytaire en fonction de l'âge

Figure 13 : Evolution des atteintes vasculaires cérébrales chez le drépanocytaire en fonction de l'âge et hypothèses physiopathologiques

Figure 14 : Coupes anatomiques de lésions anévrismales de patient drépanocytaire

Figure 15 : Vasculopathie cérébrale drépanocytaire sténosante : coupe histologique d'une grosse artère cérébrale

Figure 16 : Mécanisme de constitution des lésions sténosantes et des dilatations artérielles dans la drépanocytose

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 : Modification des paramètres de coagulation et plaquettaires chez l'adulte drépanocytaire

Table 2 : Modifications biologiques chez l'adulte et l'enfant drépanocytaire à l'état stable, lien avec la vasculopathie cérébrale

Table 3 : Paramètres biologiques recueillis dans l'étude DYVA

Table 4 : Comparaison des patients drépanocytaires inclus à l'état stable (SCD group), des témoins et des patients en crise

Table 5 : Critères diagnostiques de migraine sans aura de l'International Headache Society (révisés pour la pédiatrie)

Introduction

Les accidents vasculaires cérébraux chez l'enfant représentent une entité peu fréquente, avec une incidence estimée à environ 2,52 événements pour 100 000 enfants par an (1), la moitié de ces accidents étant de nature ischémique (infarctus cérébral). Les mécanismes en sont différents et plus variés que ceux impliqués chez l'adulte. Pour les infarctus cérébraux, une atteinte artérielle intracrânienne est retrouvée dans la majorité des cas, le plus souvent transitoire (artériopathie cérébrale transitoire). Il existe également des vasculopathies cérébrales chroniques, minoritaires parmi les causes d'infarctus cérébral de l'enfant, mais avec un potentiel de récurrence majeur et un impact sur le devenir neurologique et fonctionnel de ces enfants qui peut être dramatique (2). La vasculopathie cérébrale drépanocytaire représente une partie importante des artériopathies cérébrales chroniques de l'enfant. Elle touche les enfants avec syndrome drépanocytaire majeur (SS ou S β ⁰thalassémique). Le risque neurovasculaire est de ce fait très élevé chez l'enfant drépanocytaire, représentant une source de comorbidité ajoutée importante qui peut conduire à un handicap définitif. La vasculopathie cérébrale drépanocytaire est donc une pathologie pour laquelle l'enjeu de santé pour la population des drépanocytaires (qui représente 400 nouveaux patients avec syndrome drépanocytaire majeur par an en France, des milliers aux USA et en Afrique) est majeur. Des stratégies de dépistage, une prise en charge visant à réduire le risque d'infarctus cérébral dans l'enfance, un suivi régulier sont mis en place. Malgré tous ces efforts, le risque vasculaire cérébral reste relativement élevé chez ces enfants (même s'il a considérablement diminué avec cette prise en charge) et à l'âge adulte. Cette atteinte vasculaire cérébrale reste une pathologie multifactorielle, dans laquelle sont intriqués des facteurs liés aux modifications conformationnelles de l'érythrocyte mais aussi des facteurs liés à leurs conséquences : activation cellulaire multiple, hypoxie chronique, phénomènes d'hémolyse, de vaso-occlusion, hypercoagulabilité, etc. Ainsi, la physiopathologie des lésions artérielles cérébrales et périphériques, mais aussi les pistes thérapeutiques, restent encore insuffisamment explorées. Enfin, l'étude de l'atteinte artérielle chronique cérébrale chez l'enfant drépanocytaire, qui est une pathologie dont la population à risque est bien identifiée et suivie de manière régulière, a également un intérêt dans la compréhension des infarctus cérébraux de l'enfant tout venant. Elle peut en effet être considérée comme un modèle d'atteinte artérielle intracrânienne, dont la meilleure compréhension peut aider à améliorer celle des artériopathies transitoires, la physiopathologie et le traitement des infarctus cérébraux de l'enfant au sens large.

Le travail de recherche que nous avons élaboré et réalisé dans le cadre d'un poste d'accueil Inserm avait pour objectif de contribuer à l'amélioration de la compréhension et de la description de cette pathologie.

Nous avons choisi de travailler sur plusieurs questions d'intérêt pronostique et physiopathologique : (i) quel marqueur biologique, clinique ou mécanique est prédictif de la survenue des événements vasculaires chez l'enfant drépanocytaire ?

(ii) les céphalées chroniques sont-elles un marqueur de risque neurovasculaire chez les enfants drépanocytaires ?

(iii) quelle est l'évolution du risque cérébrovasculaire hémorragique avec la mise en place des stratégies visant à réduire les infarctus cérébraux chez ces enfants ?

Pour cela, nous avons réalisé plusieurs travaux nécessitant une collaboration multidisciplinaire. Pédiatres spécialisés en drépanocytose, biologistes, cardiologues pédiatriques et médecins vasculaires, radiologues et bien sûr neuropédiatres, nous avons voulu envisager la drépanocytose comme une maladie complexe, à la fois systémique et multi-organe mais également avec des spécificités liées à l'âge, aux caractéristiques vasculaires des différents organes, tout en étant conscients de l'inévitable variabilité interindividuelle des patients.

Les familles de ces enfants ont également été des acteurs de ce travail, acceptant avec enthousiasme de participer à nos études et souhaitant, comme nous, l'amélioration de la santé de leurs enfants. Qu'elles en soient remerciées.

A. Bibliographie

I. La vasculopathie cérébrale chez l'enfant drépanocytaire : caractérisation, dépistage, prise en charge (*aspects cliniques et radiologiques*)

La vasculopathie cérébrale est une complication fréquente et grave des syndromes drépanocytaires majeurs (drépanocytose homozygote SS et S β^0 thal). Elle a donc été très étudiée, en particulier chez l'enfant. En effet, c'est à l'âge pédiatrique que se développe la vasculopathie cérébrale sténosante des enfants drépanocytaires, et notamment avant l'âge de 10 ans. Le risque d'infarctus cérébral chez ces patients est particulièrement élevé, plus de 300 fois celui de la population pédiatrique générale. Ces infarctus artériels cérébraux peuvent être cliniquement symptomatiques, avec des signes essentiellement moteurs ou cognitifs. Il peut également s'agir d'infarctus dits silencieux, mais statistiquement associés à une dégradation cognitive. Le risque de handicap est donc élevé chez ces patients, ainsi que le risque de récurrence d'AVC.

La physiopathologie de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire est complexe. Elle n'est pas seulement liée à l'anomalie conformationnelle érythrocytaire, mais aussi aux conséquences de la circulation dans les artères cérébrales de ces érythrocytes falciformés, en termes de rhéologie, d'agression endothéliale, de réaction inflammatoire, d'activation et d'adhésion des différentes cellules sanguines, d'hypercoagulabilité, de vasomotricité, etc...

La vasculopathie cérébrale est dépistée par le doppler transcrânien (DTC), qui est la technique de référence. En effet, les études STOP ont d'une part montré que la vitesse au DTC permettait de stratifier le risque d'infarctus cérébral chez ces enfants (3), d'autre part que la réalisation de transfusion mensuelles (programme transfusionnel) chez les enfants avec DTC anormal ou ayant déjà présenté un infarctus cérébral permettait de diminuer de façon drastique respectivement le risque de premier infarctus cérébral ou de récurrence (4). Le dépistage est ainsi systématique chez les enfants avec syndrome drépanocytaire majeur, au moyen d'un DTC annuel à partir de l'âge de 2 ans.

En phase aiguë d'un infarctus cérébral chez un enfant drépanocytaire, la prise en charge repose sur la réalisation urgente d'un échange transfusionnel, puis sur la mise en place de la stratégie de prévention secondaire. Les enfants avec syndrome de moyamoya

(forme évoluée d'une vasculopathie cérébrale chronique grave) peuvent relever d'une prise en charge spécifique s'appuyant sur des techniques de revascularisation chirurgicale, en plus du programme transfusionnel.

Le programme transfusionnel est très efficace mais néanmoins contraignant et a des effets secondaires importants, motivant la recherche de stratégies alternatives. Par ailleurs, les infarctus silencieux peuvent continuer à progresser sous échanges transfusionnels et des études cherchent à évaluer d'autres stratégies thérapeutiques.

Afin de rendre compte de ces différents éléments concernant la vasculopathie cérébrale drépanocytaire de l'enfant, nous avons rédigé une revue de la littérature orientée sur la caractérisation, le dépistage et la prise en charge de cette atteinte, d'un point de vue clinique et radiologique. Cette mise au point, publiée dans les Archives de Pédiatrie, décrit donc les éléments résumés ci-dessus, à savoir la physiopathologie de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire, ses conséquences cliniques, les outils de prédiction du risque soulignant le rôle incontournable du DTC, les stratégies thérapeutiques en urgence, de prévention primaire, secondaire, de prise en charge du syndrome de moyamoya, ainsi que les limites des stratégies actuelles et les perspectives ultérieures.

Certains points n'ayant pas été développés dans cet article sont donc exposés à la suite du manuscrit de cette mise au point. Il s'agit d'éléments complémentaires concernant le DTC et le traitement par hydroxycarbamide.

Article 1 :

Drépanocytose et atteinte vasculaire cérébrale chez l'enfant.

M. Kossorotoff, D. Grévent, M. de Montalembert

Arch Pediatr. 2014 Apr;21(4):404-14

Mise au point, publiée dans Archives de Pédiatrie.



CrossMark

Reçu le :
14 mai 2013
Accepté le :
13 janvier 2014
Disponible en ligne
12 mars 2014

Disponible en ligne sur

ScienceDirect

www.sciencedirect.com

Drépanocytose et atteinte vasculaire cérébrale chez l'enfant

Cerebral vasculopathy in pediatric sickle-cell anemia

M. Kossorotoff^{a,b,*}, D. Grevent^{c,d}, M. de Montalembert^{e,f}^a Inserm UMR-SU765, faculté de pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France^b Centre national de référence de l'AVC de l'enfant, service de neuropédiatrie, hôpital Necker – Enfants Malades, AP-HP, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris cedex 15, France^c Service de radiopédiatrie, hôpital Necker – Enfants Malades, AP-HP, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris cedex 15, France^d Inserm U1000, hôpital Necker – Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris cedex 15, France^e Centre de référence des syndromes drépanocytaires majeurs, service de pédiatrie générale, hôpital Necker – Enfants Malades, AP-HP, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris cedex 15, France^f Université Paris Descartes, 75006 Paris, France

Summary

In children with sickle-cell anemia, cerebral vasculopathy is a frequent and severe complication. It is attributed not only to erythrocyte sickling but also to multiple physiological modifications associated with sickle-cell anemia: platelet and leukocyte activation, endothelial injury and remodeling, coagulation activation, hemolysis and subsequent chronic inflammation, impaired vasomotricity, etc. Intracranial large-vessel remodeling leads to clinical cerebral infarction, whereas microvascular injury and impaired vasoreactivity lead to so-called silent infarcts, which are actually associated with impaired cognitive development. Primary prevention strategies have been developed to screen children for cerebral vasculopathy and to further reduce stroke risk. Annual transcranial Doppler beginning at 2 years of age is recommended, allowing risk stratification. Patients at high risk are enrolled in a monthly transfusion exchange program, which reduces the risk of a first stroke by 90%. Chronic transfusion therapy has also demonstrated efficacy in preventing a second stroke, as a secondary prevention strategy. Lifelong treatment is recommended, as recurrent stroke has been observed when transfusion is discontinued. The burden of chronic transfusion is heavy for patients. Furthermore, several studies have shown that, despite preventing clinically symptomatic stroke, chronic transfusion therapy may not be effective concerning silent infarct progression. Other therapeutic options are currently being explored to obtain better protection with reduced side effects.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

L'atteinte vasculaire cérébrale chez les enfants ayant une drépanocytose de type homozygote SS et hétérozygote composite S/ β^0 thalassémique est fréquente et grave. Elle se manifeste par des infarctus artériels cérébraux, se traduisant par des symptômes essentiellement moteurs ou cognitifs, ou des infarctus dits silencieux, mais statistiquement associés à une dégradation cognitive. Sa physiopathologie est multifactorielle et implique non seulement l'érythrocyte mais aussi les autres cellules sanguines, l'endothélium, l'activation de la coagulation et de l'inflammation, la vasomotricité. . . En phase aiguë d'un infarctus cérébral chez un enfant drépanocytaire, la prise en charge repose sur la réalisation urgente d'un échange transfusionnel, puis sur la mise en place d'une stratégie de prévention secondaire. Le dépistage de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire se fait au moyen d'un doppler transcrânien annuel, systématique à partir de l'âge de 2 ans, ce qui permet une stratification du risque. Les enfants à risque élevé ont alors une prévention primaire reposant sur des échanges transfusionnels mensuels, qui ont pour effet de réduire drastiquement le risque d'accident vasculaire (AVC) clinique. La prévention secondaire après un premier AVC repose également sur la mise en place d'un programme d'échanges transfusionnels mensuels. Ces thérapeutiques efficaces sont néanmoins contraignantes et ont des effets secondaires importants, motivant la recherche de stratégies alternatives. De même, les infarctus silencieux peuvent progresser malgré les échanges transfusionnels et des études sont en cours afin d'évaluer d'autres stratégies thérapeutiques.

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

e-mail : manuelle.kossorotoff@nck.aphp.fr, mkossorotoff@yahoo.fr
(M. Kossorotoff).

0929-693X/\$ - see front matter © 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcped.2014.01.005> Archives de Pédiatrie 2014;21:404-414

1. Introduction

La drépanocytose est une maladie de l'hémoglobine transmise sur le mode autosomique récessif, due à une mutation du 6^e codon du gène de la chaîne β -globine ($\beta 6$ GLU \rightarrow VAL). Cette mutation est observée principalement chez les patients d'origine africaine (Afrique Noire) et des Caraïbes. Les molécules d'hémoglobine drépanocytaire (HbS) ont la propriété, sous leur forme désoxygénée, de polymériser pour former des fibres qui déforment l'érythrocyte en lui donnant sa forme caractéristique en faucille, le drépanocyte. La polymérisation des molécules d'HbS déforme la cellule, la fragilise et la rigidifie. Le drépanocyte a comme particularité d'avoir perdu ses propriétés de déformabilité et d'élasticité nécessaires pour passer à l'intérieur des petits vaisseaux de l'organisme, et d'être plus rapidement détruit qu'un globule rouge normal, ce qui rend compte de l'anémie hémolytique. En France, la drépanocytose est systématiquement dépistée à la naissance chez les nouveau-nés d'origine africaine, antillaise, d'Afrique du Nord, du Moyen- et Proche-Orient. En 2010, 409 enfants atteints de syndrome drépanocytaire majeur sont nés sur l'ensemble du territoire national (outremer inclus), selon les données de l'Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant (AFDPHE). Les syndromes drépanocytaires majeurs recouvrent différents génotypes selon que l'HbS est la seule hémoglobine anormale présente (patients homozygotes SS et hétérozygotes composites S/ β^0), ou associée à d'autres hémoglobines pathologiques (patients SC et S/ β^+). Les formes SS et S/ β^0 sont les plus sévères. Il existe en effet une production résiduelle d'hémoglobine normale chez les patients S/ β^+ qui limite la polymérisation de l'HbS. Les complications observées chez les patients atteints de syndromes drépanocytaires majeurs font intervenir plusieurs mécanismes : d'une part, des phénomènes « viscosité-vaso-occlusion » (crises vaso-occlusives [CVO] osseuses ou d'organes avec occlusion des micro-vaisseaux) et, d'autre part, des phénomènes « hémolyse-dysfonction endothéliale » (hypertension artérielle pulmonaire, priapisme). Une atteinte des vaisseaux systémiques est fréquente, d'installation progressive. Il s'agit d'une atteinte essentiellement micro-vasculaire, sous forme de glomérulopathie, rétinopathie, hypertension artérielle pulmonaire... Ces atteintes peuvent débuter dans l'enfance et sont donc régulièrement dépistées chez les enfants drépanocytaires homozygotes. À l'âge adulte, elles conduisent à une athérosclérose précoce avec un phénotype d'atteintes vasculaires pluriviscérales précoces. L'atteinte vasculaire au niveau cérébral, qui fait l'objet de cette mise au point, est elle aussi fréquente chez les enfants drépanocytaires homozygotes. Elle peut par ses conséquences être source de handicap sévère, d'où l'importance de son dépistage et de sa prise en charge.

2. Physiopathologie : l'atteinte des vaisseaux cérébraux et de leur contenu

Plusieurs éléments pathogéniques sont intriqués. La combinaison d'une activation cellulaire sanguine et endothéliale, d'une atteinte des petits et des gros vaisseaux intracérébraux (polygone de Willis et ses branches) et de l'altération de leur vasomotricité rend compte des lésions vasculaires cérébrales dans la drépanocytose [1]. Pour certains auteurs, la chronicité de ces différents mécanismes aggrave progressivement les lésions et le terme de « cercle vicieux » drépanocytaire a été employé pour décrire la progression dans le temps de l'atteinte vasculaire.

2.1. Activation des cellules sanguines et endothéliales

La drépanocytose est primitivement une atteinte de l'érythrocyte, mais cette atteinte a de très nombreuses conséquences physiopathologiques et l'atteinte vasculaire cérébrale est en réalité multifactorielle. Ainsi, même si la falciformation érythrocytaire et les anomalies rhéologiques en résultant ont un rôle physiopathologique important, les interactions des drépanocytes avec les autres cellules sanguines et avec l'endothélium jouent également un rôle majeur. Les érythrocytes, les leucocytes, les plaquettes et l'endothélium vasculaire sont activés par l'hypoxie chronique liée à l'anémie, le stress oxydatif et l'inflammation chronique. Cette activation est attestée par une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion sur ces différentes cellules, ainsi qu'une augmentation des taux plasmatiques de microparticules plaquettaires et érythrocytaires [2,3]. L'agression chronique de l'endothélium par l'hyperdébit lié à l'anémie et les lésions de reperfusion résultant d'événements occlusifs transitoires accentuent encore cet état d'activation. L'ensemble favorise le remodelage vasculaire et la constitution d'une hyperplasie intimale (sténose), la prolifération de cellules musculaires lisses, la fragmentation de la limitante élastique et l'apparition d'une fibrose (perte d'élasticité) [4].

2.2. Altération de la vasomotricité

À la perte mécanique d'élasticité s'ajoute une dysrégulation du tonus vasculaire, avec diminution de l'oxyde nitrique (NO) disponible. La production et la biodisponibilité de ce vasodilatateur endogène est en effet réduite du fait de l'hémolyse et de son rôle sur l'activité arginase plasmatique. Ces modifications ont été mises en évidence chez des patients drépanocytaires présentant une hypertension artérielle pulmonaire, qui est statistiquement associée à une atteinte vasculaire cérébrale [5].

2.3. Hypercoagulabilité

Un état d'hypercoagulabilité est décrit chez les patients drépanocytaires, lui aussi favorisé et entretenu par l'inflammation

chronique et l'interaction entre érythrocytes falciformés et endothélium vasculaire. Les principales modifications observées sont une augmentation de l'activité du facteur VIII et de l'antigène du facteur Willebrand (Ag vWF) avec augmentation des multimères de haut poids moléculaire, une diminution de la protéine S, une augmentation des marqueurs d'activation de la coagulation et de la fibrinolyse (complexes thrombine-antithrombine, fragments F1 + 2 de la prothrombine, D-dimères, complexes plasmine-antiplasmine), et une augmentation de l'expression du facteur tissulaire. L'adhésion plaquettaire est activée et une accumulation de plaquettes a été mise en évidence au niveau des sites de vaso-occlusion [6,7].

2.4. Mécanismes des accidents vasculaires cérébraux

À la différence des atteintes systémiques de la drépanocytose qui sont essentiellement micro-vasculaires, l'atteinte vasculaire cérébrale touche les gros et les petits vaisseaux. De ce fait, et du fait des altérations hémodynamiques (par défaut de vasomotricité notamment), deux types de mécanismes rendent compte des atteintes cérébrales observées. Un mécanisme d'obstruction des artères de gros ou moyen calibre engendre un infarctus du territoire propre de l'artère occluse, par exemple l'artère cérébrale moyenne (sylvienne). Ces infarctus touchent préférentiellement le cortex cérébral. A contrario, un mécanisme de nature plutôt hémodynamique, éventuellement favorisé par une sténose artérielle limitant le débit d'aval, par une réserve vasculaire perturbée et une atteinte micro-vasculaire, engendre un infarctus au niveau des zones les plus sensibles aux variations de débit de perfusion. Il s'agit des territoires dits jonctionnels, c'est-à-dire constituant une zone frontière irriguée par les dernières branches de division provenant à la fois de deux gros troncs artériels (par exemple : territoire jonctionnel antérieur aux confins des territoires de l'artère cérébrale antérieure et de l'artère cérébrale moyenne). Les infarctus dans ces zones touchent préférentiellement la substance blanche. Ce type d'atteinte liée aux mécanismes hémodynamiques et micro-vasculaires présente des similitudes physiopathologiques, histologiques et radiologiques avec l'atteinte micro-vasculaire cérébrale progressive observée de manière physiologique lors du vieillissement, et accélérée chez les sujets avec facteurs de risque vasculaires ou maladie génétique des micro-vaisseaux cérébraux (rigidification progressive des micro-vaisseaux, micro-thrombi) [8-10].

Pour une raison encore inconnue, la vasculopathie cérébrale sténosante drépanocytaire atteint de manière quasi exclusive les territoires antérieurs (carotide interne et ses branches : artère cérébrale antérieure, artère cérébrale moyenne) alors que, chez les enfants non drépanocytaires, environ 15 % des infarctus cérébraux concernent la circulation vertébro-basilaire [1].

3. L'atteinte vasculaire cérébrale : une menace réelle avec des conséquences graves

Le risque vasculaire cérébral est une menace réelle qui pèse sur les enfants avec syndrome drépanocytaire majeur, essentiellement SS et S β^0 , et ce de manière précoce. En effet, les infarctus cérébraux sont fréquents dans cette population. Une étude observationnelle longitudinale multicentrique américaine incluant plus de 4000 patients, la Cooperative Study of Sickle Cell Disease (CSSCD), a permis d'évaluer le risque spontané d'accident vasculaire cérébral symptomatique à 11 % avant l'âge de 20 ans chez les patients SS, ces événements aigus survenant pour la plupart avant l'âge de 10 ans, avec un pic entre 2 et 5 ans [11]. Le risque est donc majeur, environ 300 fois supérieur à celui des enfants du même âge non drépanocytaires, chez lesquels l'incidence des AVC est estimée à 2-3/100 000 enfants/an [12]. Les conséquences motrices et cognitives de ces accidents peuvent être dramatiques.

L'atteinte vasculaire cérébrale drépanocytaire est progressive. Elle se manifeste dans l'enfance par des accidents cliniques aigus, majoritairement des infarctus artériels cérébraux, mais aussi par des infarctus dits « silencieux », car les manifestations cliniques n'en sont pas toujours évidentes. Ces infarctus silencieux, correspondant à des lésions ischémiques de la substance blanche d'au moins 3 mm de plus grande longueur, sont présents chez 10 à 35 % des enfants drépanocytaires homozygotes. Ils sont déjà observés avant l'âge de 6 ans et augmentent en nombre et en taille avec l'âge. À l'âge de 14 ans, leur prévalence est de 37,1 %, même avec les stratégies de prévention actuelles [13,14]. En réalité, ces lésions ne sont pas si « silencieuses » que cela, et sont notamment statistiquement associées à une dégradation cognitive [15,16]. Ainsi, les infarctus cliniquement symptomatiques et ceux dits silencieux ont en réalité tous deux des conséquences motrices et cognitives.

Lorsque l'atteinte vasculaire progressive est très sévère, elle peut aller jusqu'à la constitution d'un syndrome de Moya-Moya radiologique, avec sténose progressive puis occlusion de la terminaison des carotides internes et de leurs branches, accompagnée du développement d'un réseau collatéral de néo-vaisseaux anormaux. Ce tableau radiologique s'accompagne d'un risque majeur d'événements vasculaires cérébraux répétés ischémiques puis hémorragiques et de dégradation cognitive liée à l'ischémie cérébrale chronique [17]. Les atteintes précédemment décrites sont relativement spécifiques de l'âge pédiatrique puisque chez l'adulte jeune drépanocytaire homozygote ce sont les hémorragies intracrâniennes qui deviennent prédominantes. Les infarctus artériels cérébraux ne reviennent ensuite au premier plan qu'après l'âge de 40 ans. Les hémorragies cérébrales sont essentiellement liées à la rupture des fragiles néo-vaisseaux d'un syndrome de

Moya-Moya ou à la présence d'anévrismes intracrâniens (une cinquantaine de cas rapportés) [18,19]. Il est intéressant de remarquer que ces deux types d'atteinte vasculaire cérébrale, l'une avec sténose, l'autre avec dilatation, présentent des éléments anatomopathologiques comparables dans la drépanocytose et l'hypothèse d'une origine physiopathologique commune a donc été évoquée [20]. Les patients drépanocytaires SC et $S\beta^+$ peuvent présenter de rares complications cérébro-vasculaires, plutôt à l'âge adulte. Il n'a pas été mis en évidence de risque supplémentaire d'AVC chez les patients AS.

4. Outils de prédiction du risque

4.1. Cliniques

Plusieurs éléments cliniques ont été identifiés pour tenter de prédire le risque individuel des patients. En réalité, il s'agit d'éléments statistiques observés sur de grands échantillons d'enfants drépanocytaires homozygotes et leur valeur prédictive individuelle reste faible. Il reste néanmoins que le risque vasculaire cérébral n'est pas corrélé au nombre de CVO. L'anémie (risque relatif [RR] : 1,85 par g/dL de diminution du taux d'hémoglobine, IC 95 % : 1,32–2,59) et l'hypertension artérielle systémique (RR : 1,31 pour 10 mmHg d'augmentation, IC 95 % : 1,03–1,67) sont des facteurs de risque modérés, alors que des antécédents de syndrome thoracique aigu, notamment récents (RR : 7,03, IC 95 % : 1,85–26,7) sont des facteurs de risque plus notables [11]. Il semblerait que certains enfants puissent présenter un phénotype dit « hyper-visqueux » avec une fréquence importante de CVO, et d'autres un phénotype plus « hémolytique », avec un taux d'hémoglobine totale plus bas et des marqueurs d'hémolyse élevés. Ces derniers ne présentent pas le même type de complications : ils font moins de crises douloureuses, mais plus d'hypertension artérielle pulmonaire, et constituent un sous-groupe à risque neurologique plus élevé. L'hypoxémie diurne et nocturne a également été associée à un risque augmenté d'infarctus cérébral [21,22]. Le facteur de risque clinique principal d'AVC retrouvé dans la littérature est la survenue d'accidents ischémiques transitoires, mais ceux-ci sont en réalité le reflet d'une vasculopathie cérébrale chronique déjà avancée [11]. Enfin, l'âge est également un « facteur de risque » puisqu'une étude récente a montré qu'en l'absence de signe clinique ou radiologique de vasculopathie cérébrale à l'âge de 10 ans (notamment au doppler transcrânien), le risque de premier événement vasculaire cérébral dans l'adolescence était réduit [13].

4.2. Radiologiques

Les outils radiologiques sont aujourd'hui les plus précis pour prédire le risque d'accident vasculaire cérébral chez les enfants drépanocytaires. Grâce à une étude prospective réalisée aux États-Unis dans les années 1990 sur 190 enfants et jeunes adultes, il a été démontré que la vitesse moyenne dans

les artères du polygone de Willis, exprimée par la moyenne des vitesses maximales au cours d'un cycle cardiaque (TAMMV) et mesurée au doppler transcrânien (DTC), était un facteur prédictif fort du risque de survenue d'un infarctus cérébral. Une stratification du risque d'infarctus cérébral symptomatique en fonction de ces vitesses a été établie : risque très faible (moins de 1 % de risque d'AVC par an) pour une vitesse < 170 cm/s, risque élevé (plus de 20 % de risque d'AVC dans les 12 mois, plus de 50 % dans les 30 mois) pour une vitesse \geq 200 cm/s, risque intermédiaire pour des vitesses de 170 à 199 cm/s [23].

Le DTC étant opérateur-dépendant, d'autres techniques d'imagerie vasculaire ou parenchymateuse ont été évaluées mais aucune ne s'est révélée supérieure. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) anatomique parenchymateuse montre des lésions déjà constituées, qui sont les conséquences tardives d'une vasculopathie cérébrale drépanocytaire. L'angio-IRM cérébrale a une sensibilité inférieure au DTC car elle ne montre que des lésions artérielles constituées [24]. À l'opposé, les anomalies observées au DTC peuvent être le reflet de sténoses artérielles constituées ou bien de turbulences rhéologiques, conséquences des remaniements intravasculaires, alors même que l'angio-IRM est normale. En revanche, alors que les infarctus silencieux visibles en IRM sont un facteur de risque d'accident constitué symptomatique (RR : 14) [25], ils peuvent être observés sans anomalie au doppler. De même, les vitesses mesurées au DTC ne sont pas prédictives du risque de survenue de ces infarctus silencieux [26]. Ce point s'explique probablement par le fait que les infarctus silencieux, relevant en partie de l'atteinte des petits vaisseaux intracrâniens, ne sont pas explorés par le DTC du polygone de Willis.

4.3. Génétiques et biologiques

Sur le plan génétique, les drépanocytaires SS font plus d'AVC que les SC (cf. supra) [11]. Cependant aucun haplotype bêta-globine n'a été formellement associé à un risque majoré de vasculopathie cérébrale. Par ailleurs, plusieurs facteurs biologiques modificateurs du risque d'infarctus cérébral sont à l'étude : polymorphismes du promoteur du $TNF\alpha$ (*tumor necrosis factor-alpha*), certains allèles HLA (*human leukocyte antigen*), ainsi que de multiples autres gènes candidats. Mais leur rôle à l'échelle individuelle sera probablement très modeste et les résultats des études statistiques ne seront pas forcément applicables à la prévision du risque pour l'individu [27,28].

5. Stratégies thérapeutiques

5.1. Prévention primaire : comment éviter le premier AVC chez l'enfant drépanocytaire ?

5.1.1. Dépistage annuel par DTC

La stratégie de prévention primaire a été définie en s'appuyant sur les résultats des études démontrant la prédictivité

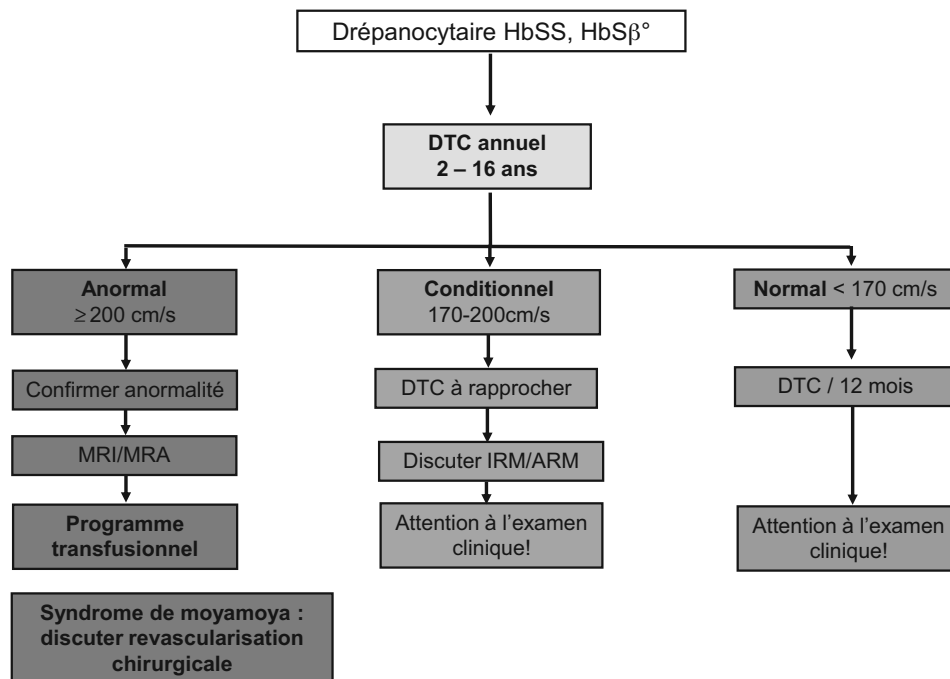


Figure 1. Stratégie actuelle de prévention primaire chez les enfants drépanocytaires SS et S/β°. DTC : doppler transcrânien ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; ARM : angio-IRM.

D'après les recommandations internationales (*The management of sickle cell disease*, Bethesda, MD, États-Unis : NIH publication No. 02-2117 ; 2002. Disponible sur Internet : URL : http://www.nhlbi.nih.gov/health/prof/blood/sickle/sc_mngt.pdf) et nationales (recommandations de la Haute Autorité de santé [HAS] pour la pratique clinique : Prise en charge de la drépanocytose chez l'enfant et l'adolescent. Paris ; 2005. Disponible sur Internet : URL : www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/Drepanocytose_reco.pdf).

du DTC. Elle a fait l'objet de recommandations internationales et nationales [29]. Elle concerne tous les enfants drépanocytaires homozygotes à partir de l'âge de 2 ans et consiste en la réalisation d'un DTC annuel à partir de l'âge de 2 ans jusqu'à 16 ans avec stratification selon les vitesses observées au DTC (cf. « Radiologiques ») (fig. 1) :

- si les vitesses sont normales, le dépistage se poursuit avec un DTC annuel ;
- si une des vitesses est ≥ 200 cm/s, éventuellement contrôlée très rapidement (1 à 2 semaines) en l'absence de facteur favorisante (fièvre, déglobulisation aiguë), il y a indication à instaurer sans attendre un programme transfusionnel mensuel (transfusions simples ou échanges transfusionnels associant une saignée et une transfusion). Pour les vitesses ≥ 220 cm/s, le programme est instauré sans contrôle du DTC. Près de 10 % des enfants drépanocytaires ont ainsi un DTC pathologique ;
- si les vitesses sont dans la catégorie intermédiaire, un contrôle rapproché (à 3–6 mois) du DTC est recommandé. En cas de vitesse anormale ou intermédiaire, une imagerie cérébrale par IRM et une angio-IRM est également recommandée, mais de façon moins urgente.

L'examen clinique régulier et l'imagerie cérébrale en urgence en cas de signe neurologique focal aigu restent de mise quel

que soit le résultat du DTC car, même s'ils sont rares, des infarctus cérébraux peuvent survenir chez des enfants avec DTC normal [30]. L'efficacité de cette stratégie de prévention primaire a été étudiée dans plusieurs séries monocentriques, notamment dans la série française de Créteil, avec une cohorte de 217 enfants SS ou Sβ° ayant bénéficié d'un dépistage par DTC précoce annuel et d'une IRM tous les 2 ans après l'âge de 5 ans [13]. Lorsque ces enfants présentaient un DTC anormal ou une sténose à l'imagerie, ils étaient pris en charge par programme transfusionnel. À l'âge de 18 ans, le risque cumulatif d'infarctus cérébral était de 1,8 % versus 11 % dans l'histoire naturelle. L'efficacité de cette stratégie est donc tout à fait nette en termes de prévention des AVC symptomatiques. Elle est plus discutable en ce qui concerne les autres aspects de la vasculopathie cérébrale : dans cette même étude, la prévalence globale des sténoses intracrâniennes était de 22,6 % et celle des infarctus silencieux de 37,1 % à l'âge de 14 ans, soit un total de lésions cérébrales ou vasculaires estimé à 50 % à l'âge de 14 ans [13].

5.1.2. Problèmes posés par les échanges transfusionnels au long cours

Les contraintes et les conséquences à long terme du programme d'échanges transfusionnels chroniques sont non

négligeables et incitent à peser attentivement toute indication. Outre la contrainte d'une journée mensuelle en hôpital de jour pour la réalisation des échanges, les transfusions chroniques induisent une surcharge en fer. Cette surcharge en fer est évitée si on réalise des érythraphérèses (automatisées), mais ces procédures sont coûteuses, nécessitent des voies d'abord de très bon calibre, rendant leur application limitée en pédiatrie. Dans les autres procédures transfusionnelles (transfusions simples, échanges manuels), la surcharge en fer est majeure, entraînant une hémochromatose potentiellement dangereuse et nécessitant l'utilisation quotidienne d'un chélateur du fer. Jusqu'aux années 2000, le chélateur majoritairement utilisé était la déféroxamine (Desferal®), très contraignante puisque administrée par voie sous-cutanée. Elle a maintenant, pour la plupart des indications, été remplacée par un chélateur oral, le déférasirox (Exjade®). Cependant, lorsque le déférasirox n'est pas bien toléré ou insuffisamment efficace, le retour à la déféroxamine sous-cutanée est nécessaire.

Ces conséquences sont d'autant plus importantes que la durée de programme transfusionnel est longue. La durée optimale du programme transfusionnel a donc été évaluée. Dans l'essai STOP 2, le programme a été arrêté de façon randomisée après au moins 30 mois chez des patients qui avaient retrouvé un DTC normal avec les transfusions. Plus d'un tiers des sujets ont alors eu à nouveau un DTC anormal et certains ont présenté un infarctus cérébral, motivant depuis lors l'indication du programme transfusionnel à vie [31]. Des stratégies alternatives ont également été étudiées.

L'hydroxyurée (Hydrea®, Siklos®) est une molécule qui présente des caractéristiques intéressantes pour la drépanocytose : réactivation de la synthèse d'hémoglobine fœtale (HbF) qui limite la croissance du polymère d'HbS, réduction de l'adhésion des érythrocytes et des leucocytes à l'endothélium activé, action vasodilatatrice (donneur de NO) [32]. Il a été montré qu'en l'absence d'infarctus, elle diminuait les vitesses au DTC, quelles que soient leurs valeurs [33]. Cette molécule a initialement été évaluée dans le cadre de la prévention des récurrences d'AVC chez les enfants drépanocytaires. Un essai de grande envergure, SWITCH (*Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea*), a notamment été mené chez des enfants drépanocytaires ayant présenté un infarctus cérébral et ayant une hémochromatose liée à un programme transfusionnel, en faisant le relais par hydroxyurée. Cette étude a dû être interrompue devant le nombre important des récurrences d'infarctus cérébraux sous hydroxyurée (7/67 soit 10 % dans le bras hydroxyurée versus 0 dans le bras poursuite des transfusions) [34]. Un essai est en cours, TWITCH (*Transfusions Changing To Hydroxyurea*), afin d'évaluer la possibilité de faire un relais par hydroxyurée pour les patients en programme transfusionnel en prévention primaire après au moins 1 an de transfusions. Actuellement, il est recommandé la mise en programme transfusionnel mensuel à vie des enfants avec DTC anormal.

5.2. Reconnaître et traiter l'AVC de l'enfant drépanocytaire à la phase aiguë

5.2.1. Évoquer et confirmer l'AVC à la phase aiguë : IRM en urgence

L'infarctus cérébral chez l'enfant drépanocytaire nécessite une prise en charge urgente et spécifique. Son diagnostic doit donc se faire le plus vite possible, dès les premiers signes cliniques. Ces signes sont similaires à ceux des enfants non drépanocytaires : il s'agit la plupart du temps d'une atteinte focale aiguë, sans trouble de conscience (peu d'atteintes de la fosse postérieure) à type d'hémiplégie, d'hémi-parésie ou de monoplégie, qui peut être accompagnée d'une paralysie faciale, de troubles sensitifs, d'une aphasie (qu'il faut penser à rechercher chez les plus petits). Une ou plusieurs crises épileptiques peuvent accompagner cette symptomatologie déficitaire. Ainsi, chez un enfant drépanocytaire homozygote, et ce quels que soient les résultats de ses DTC de dépistage, la survenue aiguë d'un ou de plusieurs de ces signes cliniques doit absolument faire évoquer en priorité le diagnostic d'infarctus cérébral. Le premier épisode survient presque toujours avant l'âge de 10 ans, les premiers infarctus chez l'adolescent étant rares [13].

L'évocation du diagnostic d'infarctus cérébral doit conduire à l'IRM en urgence afin de le confirmer et d'instaurer le traitement spécifique. L'IRM cérébrale avec séquence de diffusion au minimum et idéalement une séquence de perfusion confirme le diagnostic d'infarctus cérébral récent, dans un territoire artériel ou jonctionnel. L'imagerie (IRM + angio-IRM) permet également d'observer des lésions chroniques parenchymateuses et artérielles (fig. 2). Les lésions parenchymateuses peuvent être uniques ou multiples : aspect cicatriciel d'infarctus dans un ou plusieurs territoires artériels ou jonctionnels, corticaux ou sous-corticaux (avec éventuellement perte de substance, gliose, atrophie), lésions ischémiques de la substance blanche de taille variable (de punctiformes à étendues), hypersignaux vasculaires ou « flux lents » en séquence FLAIR (signant le ralentissement du débit artériel). Les lésions artérielles peuvent être des irrégularités de calibre, des sténoses, voire une occlusion.

5.2.2. Traitement : échange transfusionnel en urgence

Le traitement de l'infarctus cérébral chez l'enfant drépanocytaire homozygote est l'échange transfusionnel en urgence, manuel ou automatisé, avec un objectif d'hémoglobine $S < 30\%$. Lorsque la mise en place prévisible de l'échange transfusionnel est longue (nécessité d'un cathéter veineux central, de compatibilisation du sang...), une transfusion simple doit être réalisée sans attendre pour augmenter le taux d'hémoglobine autour de 10 g/dL. L'objectif est d'améliorer l'extraction d'oxygène sans trop augmenter la viscosité et de permettre la circulation d'érythrocytes non drépanocytaires. Cette prise en charge permet une amélioration rhéologique

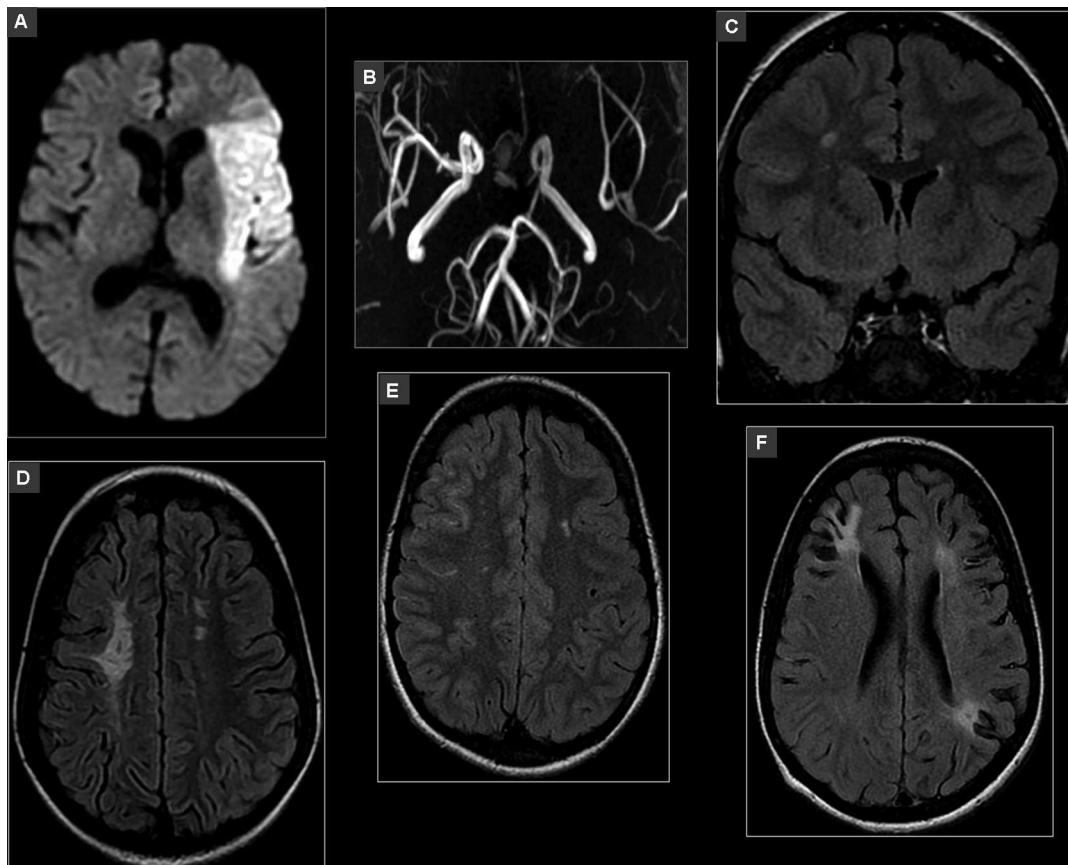


Figure 2. Aspects en imagerie par résonance magnétique (IRM) des lésions cérébrales vasculaires et parenchymateuses dans la drépanocytose. **A, B.** Infarctus sylvien gauche superficiel avec artériopathie sévère (phase aiguë). **A.** IRM : séquence de diffusion, lésion parenchymateuse ischémique récente en hypersignal. **B.** Angio-IRM : séquence 3DTOF, segments proximaux de l'artère cérébrale moyenne (sylvienne) gauche non visibles, occlusion probable. **C, D, E.** IRM : séquence FLAIR, lésions jonctionnelles de la substance blanche : infarctus silencieux. **C.** Coupe coronale, hypersignal punctiforme jonctionnel antérieur droit de plus de 3 mm. **D.** Coupe axiale, lésions bilatérales de la substance blanche jonctionnelle antérieure, étendue en plage à droite, hypersignaux multiples à gauche. **E.** Coupe axiale, multiples hypersignaux punctiformes bilatéraux et hypersignaux vasculaires (« flux lents ») à droite. **F.** IRM : séquence FLAIR, coupe axiale, infarctus cérébraux (AVC) anciens jonctionnels antérieur droit, postérieur gauche et plage d'hypersignal de la substance blanche jonctionnelle antérieure gauche.

rapide et la désagrégation de l'obstacle intravasculaire constitué essentiellement d'érythrocytes falciformés et de cellules sanguines activées adhérentes. L'utilisation d'un thrombolytique (rt-PA) n'est pas recommandée car ce type de produit fibrinolytique est utile pour des thromboses classiques essentiellement constituées de fibrine. De plus, il semblerait que le risque de transformation hémorragique soit augmenté chez les patients avec vasculopathie sévère type Moya-Moya [35].

La prise en charge rééducative ne doit pas être négligée, abordant à la fois les aspects moteurs mais aussi cognitifs, qui doivent être systématiquement recherchés dans ces circonstances. Les séquelles de ces infarctus cérébraux sont en effet fréquentes mais souvent sous-estimées, notamment les séquelles cognitives. Après un infarctus cérébral chez un enfant drépanocytaire, un programme de prévention secondaire doit être systématiquement mis en place, le risque de récurrence d'accident aigu étant évalué à 70 % dans les 2 à 3 ans sans prise en charge préventive [36,37].

5.3. Prévention secondaire : comment empêcher la survenue d'un deuxième AVC ?

5.3.1. Programme transfusionnel mensuel

La mise en place d'un programme transfusionnel mensuel chez tout patient drépanocytaire ayant présenté un infarctus artériel cérébral est aujourd'hui la stratégie recommandée. Elle repose sur des études observationnelles ayant montré une diminution de 90 % du risque de récurrence avec cette stratégie [38-40]. La surveillance du taux d'hémoglobine S pré- et post-transfusionnel permet d'adapter le délai inter-échange, car l'objectif est idéalement de maintenir cette HbS < 30 %. L'efficacité de cette prise en charge sur la récurrence des infarctus cérébraux est nette, celle-ci restant cependant autour de 10 % [39]. L'efficacité sur la progression de la vasculopathie et l'incidence des infarctus silencieux est moins nette. En effet, des suivis longitudinaux de patients transfusés régulièrement ont montré une possible progression de

l'atteinte vasculaire sur le TCD ou sur l'angio-IRM ainsi qu'une augmentation malgré le programme transfusionnel du nombre d'infarctus silencieux sur des IRM cérébrales systématiques [41–43]. Les contraintes et les conséquences du programme transfusionnel au long cours sont les mêmes qu'il s'agisse de prévention primaire ou secondaire. Les premiers essais d'arrêt des programmes transfusionnels ont montré un taux élevé de récurrence d'AVC et le maintien des transfusions à vie a alors été recommandé [44].

5.3.2. Alternatives au programme transfusionnel : place de l'hydroxyurée et de la greffe de moelle osseuse

Plusieurs stratégies alternatives ont été essayées en prévention secondaire des AVC de l'enfant drépanocytaire. Comme mentionné à propos de la prévention primaire, plusieurs études testant l'efficacité d'un relais du programme transfusionnel par l'hydroxyurée chez des enfants ayant présenté un AVC ont montré un taux de récurrence supérieur avec l'hydroxyurée [32,34,45]. Les échanges transfusionnels avec chélation par déférasirox restent donc la stratégie de référence en prévention secondaire des infarctus cérébraux chez l'enfant drépanocytaire homozygote. L'hydroxyurée garde néanmoins un intérêt pour les patients non transfusables du fait d'un groupe sanguin rare ou, dans certains pays, de la non-disponibilité de produits sanguins sécurisés.

La greffe de moelle osseuse a également été étudiée comme stratégie de prévention secondaire des infarctus cérébraux chez ces enfants. Il s'agit à ce jour du seul traitement curatif de la drépanocytose, les projets de thérapie génique n'ayant pas encore abouti. Après une greffe de moelle géno-identique après conditionnement myélo-ablatif, la survie sans effet indésirable est de 90 % environ et le patient est alors « guéri » de sa drépanocytose. Il n'y a pas eu de récurrence d'infarctus cérébral dans les séries publiées et à l'imagerie on observe une stabilité ou une amélioration des lésions artérielles cérébrales et des infarctus silencieux, ainsi qu'une diminution des vitesses au DTC [46]. La stabilisation sans amélioration des lésions artérielles ne permet pas de considérer que les patients concernés sortent complètement du groupe à risque malgré la lourdeur de la thérapie. Une étude multicentrique française (Drépa-greffe) est actuellement en cours afin de comparer le devenir de patients ayant fait un infarctus cérébral et ayant bénéficié d'une greffe de moelle osseuse avec arrêt ou non du programme transfusionnel. Par ailleurs, pour cette population d'origine afro-antillaise, les donneurs de moelle osseuse sur les fichiers européens sont rares car majoritairement caucasiens. Ainsi, une des difficultés est de trouver un donneur HLA compatible intrafamilial : frère, sœur, ou sang de cordon congelé d'un frère ou d'une sœur. Pour le moment, les greffes haplo-identiques de donneur ou de cordon ne sont pas réalisées en routine car le taux de rejet y est plus élevé. Ces contraintes limitent à ce jour le nombre de greffes qui peuvent être proposées aux enfants drépanocytaires les plus symptomatiques.

5.4. Prise en charge du syndrome de Moya-Moya

L'évolution des lésions artérielles cérébrales peut se faire dans les formes sévères vers un syndrome de Moya-Moya, avec un risque ischémique et hémorragique important, et des conséquences cognitives et motrices. La découverte radiologique d'un syndrome de Moya-Moya doit conduire à un avis neuro-chirurgical car le programme transfusionnel n'est généralement pas suffisant pour empêcher la survenue d'un nouvel AVC. Une revascularisation cérébrale chirurgicale est en effet possible. Elle s'appuie sur le fait que les vaisseaux provenant de la carotide externe ne sont pas touchés dans ce syndrome. Chez l'enfant, les techniques de revascularisation indirecte (multicraniostomie ou « trous de trépan multiples ») sont préférées aux techniques directes (pontage), plus difficiles techniquement. La technique de multicraniostomie permet de mettre en contact de petites branches vasculaires du scalp ou du périoste provenant de la carotide externe (donc saines) avec la surface cérébrale. Un appel chémo-attractant angiogénique stimulé par l'hypoxémie tissulaire favorise ainsi la constitution de néo-vaisseaux transduraires à partir de ces petites branches, permettant une revascularisation du parenchyme cérébral de façon centripète. Les indications chirurgicales dépendent de plusieurs facteurs, dont l'aspect angiographique et l'histoire clinique. En général, le programme transfusionnel est maintenu malgré la chirurgie. Très peu d'enfants drépanocytaires ont été opérés, mais les résultats postopératoires sont encourageants avec un taux très faible d'infarctus postopératoire et une stabilisation des lésions parenchymateuses en IRM [47].

6. Limites des stratégies actuelles et perspectives

Les stratégies actuelles de prévention primaire et secondaire reposent donc sur les programmes d'échanges transfusionnels, avec les contraintes et conséquences évoquées précédemment, ayant motivé l'évaluation de stratégies alternatives. Par ailleurs, la question de l'efficacité de ces stratégies reste discutée. En effet, si l'effet pour la prévention de la survenue d'un premier ou second AVC est net, on a vu précédemment que l'efficacité sur les infarctus silencieux et sur les troubles cognitifs est plus discutable.

6.1. Problème des infarctus silencieux

Si l'efficacité du programme transfusionnel est nette sur la prévention secondaire des infarctus cliniquement symptomatiques, celle sur l'évolutivité en imagerie de la vasculopathie et sur l'incidence des infarctus silencieux est beaucoup plus discutée. En effet, la progression radiologique de la vasculopathie se poursuit chez un certain nombre de patients, notamment lorsque cette vasculopathie était déjà évoluée à la mise en route du programme (sténose déjà constituée en

imagerie) [41–43]. L'efficacité de la mise en place d'un programme transfusionnel chez des enfants présentant des infarctus silencieux sans anomalie du DTC est en cours d'évaluation par l'étude SIT (Silent cerebral Infarct Trial), dont les résultats ne seront pas connus avant 2014 [48]. Cette question est importante car les infarctus silencieux sont associés à un risque élevé d'infarctus cliniquement symptomatique et à une dégradation cognitive [49].

Cette discordance des résultats pourrait être expliquée par le fait que les stratégies de prise en charge développées jusqu'alors s'appuient essentiellement sur des techniques détectant l'atteinte des atteintes des gros vaisseaux (polygone de Willis et carotides internes) pour prévenir des infarctus cliniquement symptomatiques (correspondant aux territoires des grosses artères intracrâniennes). Les infarctus silencieux, de mécanisme micro-vasculaire et hémodynamique, n'entrent pas dans ce cadre à proprement parler et nécessitent de développer des stratégies spécifiques.

6.2. Problème des troubles cognitifs

Les enfants drépanocytaire homozygotes présentent des difficultés scolaires plus fréquentes que leurs frères et sœurs non drépanocytaires, comparaison qui permet de s'affranchir du niveau socioculturel. Ces difficultés ont été objectivées sur des évaluations neuropsychologiques : il s'agit essentiellement de troubles des fonctions exécutives (programmation, stratégies) et d'attention. En réalité, ces difficultés sont présentes dès l'âge préscolaire puisque certaines études ont rapporté un développement cognitif significativement inférieur chez les très jeunes enfants [50]. Les éléments statistiquement associés à ces difficultés sont les mêmes que ceux associés à la vasculopathie cérébrale, ce qui suggère un mécanisme commun : taux d'hémoglobine totale bas, taux d'hémoglobine fœtale (HbF) bas, vitesse élevée au DTC, désaturations nocturnes, troubles du sommeil [51]. Ces associations sont statistiques et l'utilisation de ces données pour prédire l'évolution cognitive d'un enfant donné est très difficile. Ainsi l'indication d'un programme transfusionnel devant l'apparition ou l'aggravation de difficultés scolaires, objectivées sur un bilan neuropsychologique ou des bilans successifs, n'est pas retenue à ce jour. L'efficacité des transfusions sur les difficultés cognitives en dehors des DTC pathologiques n'a pas été évaluée.

6.3. Rôle des vaisseaux cervicaux

La plupart des études se sont focalisées sur les vaisseaux intracrâniens. Dans une étude prospective d'imagerie par IRM réalisée pour des indications variées chez des enfants et des adultes drépanocytaires (infarctus clinique, DTC anormal...), des lésions des carotides internes à l'étage cervical étaient présentes chez 15 % des patients. Pour ceux qui présentaient un infarctus cérébral récent ou ancien, l'image pouvait être compatible avec une dissection, et un mécanisme thromboembolique à partir du site de la dissection pouvait être

envisagé pour expliquer l'AVC [52]. La question est donc posée du rôle des anomalies des artères carotides à l'étage cervical dans la physiopathologie de certains infarctus cérébraux sans DTC anormal et sans vasculopathie intracrânienne ou avec des sténoses modérées. Là encore, il n'y a de consensus ni sur l'intérêt de dépister systématiquement les atteintes artérielles cervicales, ni sur leur valeur prédictive de survenue d'infarctus symptomatiques et silencieux, ni sur leur prise en charge thérapeutique.

6.4. Hémorragie cérébrale et lien avec la vasculopathie cérébrale drépanocytaire

Les hémorragies cérébrales sont rares chez l'enfant drépanocytaire. Leur prise en charge et leur lien avec la vasculopathie sténosante (risque ischémique) ne sont pas définis. De même que chez l'adulte jeune, d'exceptionnels anévrysmes intracrâniens ont été décrits chez l'enfant, avec des lésions anatomopathologiques similaires à celles observées dans la vasculopathie sténosante, sans qu'il soit possible à ce jour d'en déduire une conduite à tenir sur le long terme (indication d'échanges transfusionnels, de l'hydroxyurée ?).

6.5. Perspectives

Les données physiopathologiques de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire permettent d'orienter les essais thérapeutiques vers des molécules dont le site d'action n'est pas l'érythrocyte mais qui visent à modifier les conséquences de la falciformation. Plusieurs molécules sont ainsi à l'étude, même si pour le moment aucune étude humaine n'a permis de valider leur efficacité, parfois suggérée chez l'animal. Plusieurs études ont même dû être interrompues précocement du fait d'effets secondaires importants (recrudescence des crises vaso-occlusives...). Face au déficit de vasodilatation périphérique et pulmonaire des enfants drépanocytaires, des molécules telles que le sildénafil ou le NO, connues par les cardiologues pour leurs effets vasodilatateurs pulmonaires et utilisées dans certaines situations d'hypertension artérielle pulmonaire en pédiatrie, ont été identifiées comme molécules candidates pour traiter la vasculopathie cérébrale. Une supplémentation en arginine, qui favoriserait la voie endogène de production du NO, a été étudiée chez l'animal, et est au stade préliminaire de son étude chez l'homme. Une des voies prometteuses est l'utilisation des statines, molécules connues par les médecins d'adulte et largement utilisées chez les patients à risque vasculaire pour leurs propriétés anti-inflammatoires et d'amélioration de la fonction endothéliale. Une étude préliminaire a montré une réduction de certains marqueurs biologiques, mais l'efficacité clinique n'a pas encore été évaluée [53]. Une étude bien conduite évaluant l'efficacité de l'aspirine chez les patients avec DTC anormal ou sténose avérée serait également intéressante. En effet, cette molécule simple et peu onéreuse, ayant une activité d'anti-agrégant plaquettaire reconnue comme efficace dans les

artériopathies cérébrales de l'adulte (athérosclérose...) paraît envisageable chez des patients drépanocytaires ayant des plaquettes activées. Pour le moment, il n'existe pas de recommandation quant à son utilisation car les études publiées étaient méthodologiquement insuffisantes, mais la perspective reste intéressante [54].

Des perspectives intéressantes sont aussi à envisager parmi les techniques d'imagerie cérébrale et notamment vasculaire, afin d'améliorer leur sensibilité diagnostique des anomalies vasculaires. Des techniques d'IRM peu invasives d'analyse de débit sans injection de produit de contraste, comme le marquage magnétique des spins (ASL), ou les mesures de variation de débit sanguin (BOLD) sont en cours d'évaluation dans ce contexte. D'autres techniques d'évaluation du débit sanguin cérébral ou de consommation énergétique pourraient également avoir des applications dans le domaine de la drépanocytose, comme la scintigraphie cérébrale (SPECT) ou la tomographie cérébrale par émission de positons (PET), qui ont été utilisées dans cette pathologie mais n'ont pas été comparées au DTC. Enfin, la sécurité des greffes de moelle osseuse ne cesse de s'améliorer, permettant d'envisager l'extension des indications. Des projets de thérapie génique pourraient également voir le jour.

7. Conclusion

La vasculopathie cérébrale est une complication fréquente et grave des syndromes drépanocytaires majeurs, avec des sanctions thérapeutiques lourdes. La stratégie de dépistage par le DTC et la prévention primaire et secondaire par les programmes d'échanges transfusionnels sont efficaces sur la survenue d'accidents symptomatiques. Les objectifs sont maintenant de mettre au point des prises en charge moins lourdes pour les patients et d'identifier et de traiter les atteintes plus discrètes cliniquement mais tout aussi redoutables, comme les infarctus silencieux ou les troubles cognitifs.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Aide financière : Le Dr Kossorotoff est financée par l'Inserm dans le cadre d'un poste d'accueil pour un projet de recherche concernant la vasculopathie cérébrale drépanocytaire.

Références

- [1] Switzer JA, Hess DC, Nichols FT, et al. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. *Lancet Neurol* 2006;5:501–12.
- [2] Kato GJ, Martyr S, Blackwelder WC, et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with

- sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol* 2005;130: 943–53.
- [3] Frenette PS. Sickle cell vaso-occlusion: multistep and multicellular paradigm. *Curr Opin Hematol* 2002;9:101–6.
- [4] Platt OS. Preventing stroke in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 2005;353:2743–5.
- [5] Morris CR, Suh JH, Hagar W, et al. Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood* 2008;111:402–10.
- [6] Ataga KI, Key NS. Hypercoagulability in sickle cell disease: new approaches to an old problem. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;1:91–6.
- [7] Lee SP, Ataga KI, Orringer EP, et al. Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1626–31.
- [8] Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2011;42:2672–713.
- [9] Elsharawy MA, Moghazy KM, Shawarby MA. Atherosclerosis in sickle cell disease – a review. *Int J Angiol* 2009;18:62–6.
- [10] de Montalembert M, Aggoun Y, Niakate A, et al. Endothelial-dependent vasodilation is impaired in children with sickle cell disease. *Haematologica* 2007;92:1709–10.
- [11] Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 1998;91:288–94.
- [12] Roach ES, Golomb MR, Adams R, et al. Management of stroke in infants and children: a scientific statement from a Special Writing Group of the American Heart Association Stroke Council and the Council on Cardiovascular Disease in the Young. *Stroke* 2008;39:2644–91.
- [13] Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood* 2011;117:1130–40.
- [14] Pegelow CH, Macklin EA, Moser FG, et al. Longitudinal changes in brain magnetic resonance imaging findings in children with sickle cell disease. *Blood* 2002;99:3014–8.
- [15] Schatz J, Brown RT, Pascual JM, et al. Poor school and cognitive functioning with silent cerebral infarcts and sickle cell disease. *Neurology* 2001;56:1109–11.
- [16] Bernaudin F, Verlhac S, Fréard F, et al. Multicenter prospective study of children with sickle cell disease: radiographic and psychometric correlation. *J Child Neurol* 2000;15:333–43.
- [17] Dobson SR, Holden KR, Nietert PJ, et al. Moyamoya syndrome in childhood sickle cell disease: a predictive factor for recurrent cerebrovascular events. *Blood* 2002;99:3144–50.
- [18] Brandão RA, de Carvalho GT, Reis BL, et al. Intracranial aneurysms in sickle cell patients: report of 2 cases and review of the literature. *Surg Neurol* 2009;72:296–9.
- [19] Moritani T, Numaguchi Y, Lemer NB, et al. Sickle cell cerebrovascular disease: usual and unusual findings on MR imaging and MR angiography. *Clin Imaging* 2004;28:173–86.
- [20] Oyesiku NM, Barrow DL, Eckman JR, et al. Intracranial aneurysms in sickle-cell anemia: clinical features and pathogenesis. *J Neurosurg* 1991;75:356–63.
- [21] Kirkham FJ, Hewes DK, Prengler M, et al. Nocturnal hypoxaemia and central-nervous-system events in sickle-cell disease. *Lancet* 2001;357:1656–9.
- [22] Tripathi A, Jerrell JM, Stallworth JR. Cost-effectiveness of adenotonsillectomy in reducing obstructive sleep apnea,

- cerebrovascular ischemia, vaso-occlusive pain, and ACS episodes in pediatric sickle cell disease. *Ann Hematol* 2011;90:145–50.
- [23] Adams R, McKie V, Nichols F, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 1992;326:605–10.
- [24] Abboud MR, Cure J, Granger S, et al. Magnetic resonance angiography in children with sickle cell disease and abnormal transcranial Doppler ultrasonography findings enrolled in the STOP study. *Blood* 2004;103:2822–6.
- [25] Miller ST, Macklin EA, Pegelow CH, et al. Silent infarction as a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anemia: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *J Pediatr* 2001;139:385–90.
- [26] Wang WC, Gallagher DM, Pegelow CH, et al. Multicenter comparison of magnetic resonance imaging and transcranial Doppler ultrasonography in the evaluation of the central nervous system in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000;22:335–9.
- [27] Hoppe C, Klitz W, D'Harlingue K, et al. Confirmation of an association between the TNF(-308) promoter polymorphism and stroke risk in children with sickle cell anemia. *Stroke* 2007;38:2241–6.
- [28] Flanagan JM, Frohlich DM, Howard TA, et al. Genetic predictors for stroke in children with sickle cell anemia. *Blood* 2011;117:6681–4.
- [29] Adams RJ, McKie VC, Hsu L, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 1998;339:5–11.
- [30] Adams RJ, Brambilla DJ, Granger S, et al. Stroke and conversion to high risk in children screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOP study. *Blood* 2004;103:3689–94.
- [31] Adams RJ, Brambilla D, Optimizing Primary Stroke Prevention in Sickle Cell Anemia (STOP 2) Trial Investigators. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med* 2005;353:2769–78.
- [32] Ware RE, Schultz WH, Yovetich N, et al. Stroke with transfusions changing to hydroxyurea (SWITCH): a phase III randomized clinical trial for treatment of children with sickle cell anemia, stroke, and iron overload. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:1011–7.
- [33] Zimmerman SA, Schultz WH, Burgett S, et al. Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia. *Blood* 2007;110:1043–7.
- [34] Ware RE, Helms RW, SWITCH Investigators. Stroke with transfusions changing to hydroxyurea (SWITCH). *Blood* 2012;119:3925–32.
- [35] Kossorotoff M, Meyer P, Lebas A, et al. Recommandations formalisées d'experts : prise en charge de l'AVC par le réanimateur. Particularités pédiatriques (nouveau-né exclu). *Rev Neurol* 2012;168:527–32.
- [36] Abboud MR, Atweh GF. Prevention and management of strokes in patients with sickle cell disease. *Curr Hematol Rep* 2006;5:15–22.
- [37] Powars D, Wilson B, Imbus C, et al. The natural history of stroke in sickle cell disease. *Am J Med* 1978;65:461–71.
- [38] Hulbert ML, Scothorn DJ, Panepinto JA, et al. Exchange blood transfusion compared with simple transfusion for first overt stroke is associated with a lower risk of subsequent stroke: a retrospective cohort study of 137 children with sickle cell anemia. *J Pediatr* 2006;149:710–2.
- [39] Pegelow CH, Adams RJ, McKie V, et al. Risk of recurrent stroke in patients with sickle cell disease treated with erythrocyte transfusions. *J Pediatr* 1995;126:896–9.
- [40] Riddington C, Wang W. Blood transfusion for preventing stroke in people with sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;1:CD003146.
- [41] Bader-Meunier B, Verlhac S, Elmaleh-Bergès M, et al. Effect of transfusion therapy on cerebral vasculopathy in children with sickle-cell anemia. *Haematologica* 2009;94:123–6.
- [42] Brousse V, Hertz-Pannier L, Consigny Y, et al. Does regular blood transfusion prevent progression of cerebrovascular lesions in children with sickle cell disease? *Ann Hematol* 2009;88:785–8.
- [43] Hulbert ML, McKinstry RC, Lacey JL, et al. Silent cerebral infarcts occur despite regular blood transfusion therapy after first strokes in children with sickle cell disease. *Blood* 2011;117:772–9.
- [44] Wang WC, Kovnar EH, Tonkin IL, et al. High risk of recurrent stroke after discontinuance of five to twelve years of transfusion therapy in patients with sickle cell disease. *J Pediatr* 1991;118:377–82.
- [45] Strouse JJ, Heeney MM. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease: efficacy, barriers, toxicity, and management in children. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59:365–71.
- [46] Bernaudin F, Socie G, Kuentz M, et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood* 2007;110:2749–56.
- [47] Smith ER, McClain CD, Heeney M, et al. Pial synangiosis in patients with moyamoya syndrome and sickle cell anemia: perioperative management and surgical outcome. *Neurosurg Focus* 2009;26:E10.
- [48] Casella JF, King AA, Barton B, et al. Design of the silent cerebral infarct transfusion (SIT) trial. *Pediatr Hematol Oncol* 2010;27:69–89.
- [49] Steen RG, Miles MA, Helton KJ, et al. Cognitive impairment in children with hemoglobin SS sickle cell disease: relationship to MR imaging findings and hematocrit. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24:382–9.
- [50] Hogan AM, Kirkham FJ, Prengler M, et al. An exploratory study of physiological correlates of neurodevelopmental delay in infants with sickle cell anaemia. *Br J Haematol* 2006;132:99–107.
- [51] Ruffieux N, Njamnshi AK, Wonkam A, et al. Association between biological markers of sickle cell disease and cognitive functioning amongst Cameroonian children. *Child Neuropsychol* 2013;19:143–60.
- [52] Telfer PT, Evanson J, Butler P, et al. Cervical carotid artery disease in sickle cell anemia: clinical and radiological features. *Blood* 2011;118:6192–9.
- [53] Hoppe C, Kuypers F, Larkin S, et al. A pilot study of the short-term use of simvastatin in sickle cell disease: effects on markers of vascular dysfunction. *Br J Haematol* 2011;153:655–63.
- [54] Charneski L, Congdon HB. Effects of antiplatelet and anticoagulant medications on the vasoocclusive and thrombotic complications of sickle cell disease: a review of the literature. *Am J Health Syst Pharm* 2010;67:895–900.

Cette mise au point permettait de présenter un certain nombre d'éléments caractérisant la vasculopathie cérébrale drépanocytaire, sa physiopathologie, ses conséquences et leur prise en charge, ainsi que les stratégies thérapeutiques.

Nous présentons en complément des données concernant le doppler transcrânien : le protocole de mesure utilisé chez les drépanocytaires, son utilisation en pratique courante et ses limites, ainsi que le raisonnement de son utilisation dans les différents travaux présentés dans la partie B. Nous présentons également des informations complémentaires concernant l'anatomie pathologique des lésions artérielles cérébrales et leurs corrélats en imagerie, ainsi que des données relatives au traitement par hydroxycarbamide.

1. Le Doppler transcrânien (DTC)

Le Doppler transcrânien reste aujourd'hui la technique de référence pour le diagnostic et le suivi de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire. La mesure de la vitesse sanguine permet une stratification du risque cérébrovasculaire en 3 groupes : DTC anormal ou pathologique (vitesse $>200\text{cm/s}$) avec risque élevé, DTC conditionnel ou limite (vitesse entre 170 et 200 cm/s) avec risque intermédiaire, DTC normal (vitesse $<170\text{ cm/s}$) avec risque cérébrovasculaire faible (3) (figure 1). Le risque est donc clairement stratifié pour les catégories DTC anormal et DTC normal. Par contre, pour les patients avec DTC conditionnel, ils peuvent évoluer vers un DTC pathologique (taux cumulé de conversion en DTC pathologique de 23% en 18 mois) ou redevenir normaux (5). Ils nécessitent donc un contrôle rapproché de leur DTC.

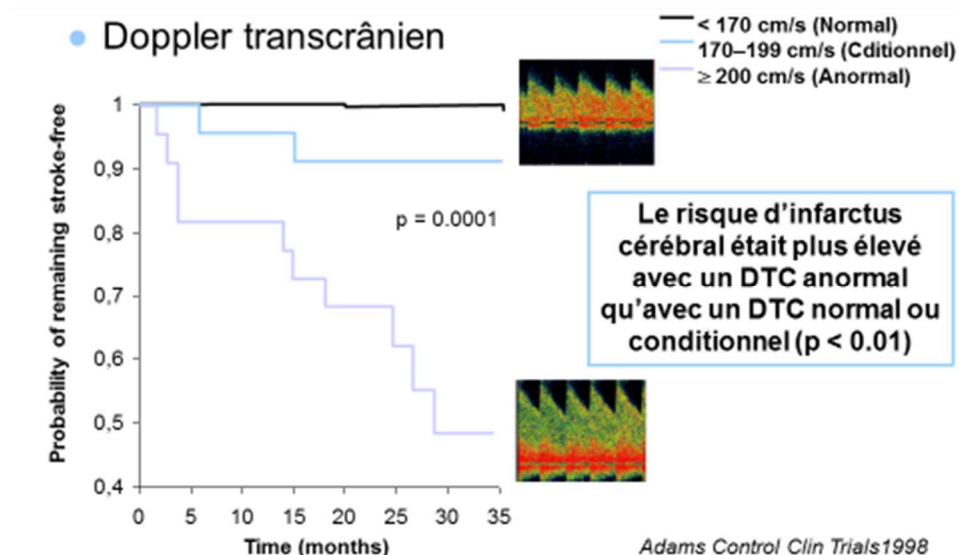


Figure 1 : probabilité de survie sans infarctus cérébral selon la catégorie du DTC
D'après Adams Control Clin Trials 1998 et Adams New Engl J Med 1992 (3,6)

- a. Le protocole DTC utilisé dans les essais STOP : protocole de référence dans la drépanocytose

Le protocole décrit dans ces études de grande envergure qui ont établi le rôle pronostique du DTC est celui qui est maintenant utilisé partout et est devenu le protocole de référence pour le dépistage et le suivi des atteintes cérébrales vasculaires dans la drépanocytose.

Le doppler transcrânien utilise les fenêtres osseuses temporales. Il se pratique patient éveillé et coopérant. Les volumes d'enregistrement des flux et leur profondeur sont définis. Dans les essais STOP, ce sont des Dopplers sans imagerie (i.e. sans échographie de repérage associée) qui ont été utilisés, sans correction d'angle.

Le paramètre recueilli n'est pas la vitesse maximale en tant que telle. Il s'agit de l'enveloppe du spectre de vitesses maximales, moyenné dans le temps, appelée TAMMV (time-averaged mean maximal velocity). L'ordinateur moyenne les vitesses maximales dans le temps et détermine la TAMMV. Pour l'opérateur, il s'agit de mesurer la TAMMV la plus élevée, ce qui requiert des mesures soigneuses sur toute la longueur du vaisseau, avec une optimisation de la forme du spectre obtenu (7) (figure 2).

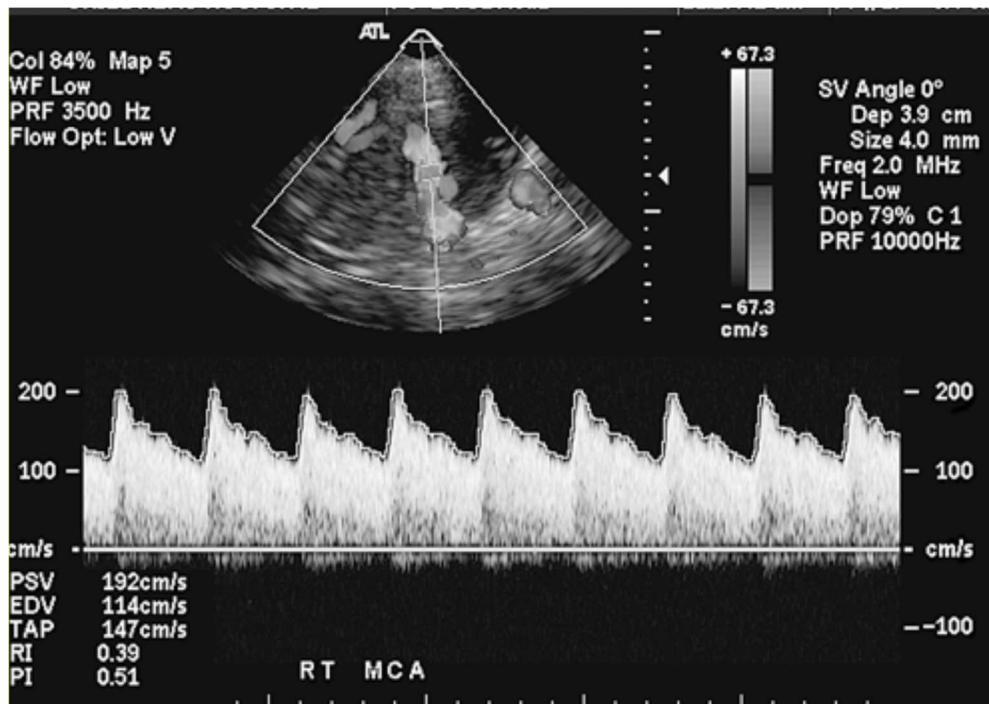


Figure 2 : Mesure automatisée de la TAMMV, avec moyennage dans le temps de la vitesse maximale

Tiré de Bulas, *Pediatr Radiol* 2005 (7).

Le fait de moyenner permet d'améliorer la significativité hémodynamique et de minimiser l'erreur inhérente de mesure. En effet, comparativement à l'interprétation de seules valeurs systoliques ou diastoliques, le moyennage diminue la dépendance par rapport à des facteurs cardiovasculaires centraux, tels que fréquence cardiaque, contractilité, résistances périphériques totales, compliance aortique. Ainsi, la TAMMV et la PSV (vitesse systolique au pic) prédisent mieux le risque d'infarctus cérébral que la vitesse diastolique. La TAMMVX est inférieure à la vitesse systolique au pic (PSV). Le seuil de PSV équivalent au seuil de TAMMV pathologique serait ainsi de 250cm/s, le seuil conditionnel entre 200 et 250cm/s (7,8). La TAMMV reste le paramètre utilisé car elle corrèle mieux avec la perfusion que la PSV.

b. Limites du DTC

Le DTC est une technique opérateur-dépendant. C'est pourquoi l'utilisation d'un protocole standardisé est indispensable pour garantir une réelle qualité et reproductibilité des résultats, d'autant que des décisions thérapeutiques majeures, comme la mise sous programme transfusionnel, sont prises en fonction des résultats de cet examen.

Plusieurs facteurs influencent le DTC. En premier lieu, les circonstances s'accompagnant d'une augmentation du débit cardiaque, et donc de la vitesse de déplacement des flux sanguins, sont associées à des vitesses plus élevées au DTC : l'hypoxie, la fièvre, et l'aggravation de l'anémie (7). On sait également que les enfants les plus jeunes, qui ont une fréquence cardiaque plus élevée, ont des vitesses plus élevées au DTC.

Il existe également une variation intra-individuelle. La comparaison de deux DTC réalisés chez 812 enfants à moins de 6 mois d'intervalle a en effet montré une déviation standard pour un même sujet de 14,9 cm/sec, avec 1% des sujets qui présentaient d'importantes variations entre les 2 examens. Cette variabilité reste stable quelle que soit la vitesse mesurée. Dans cette série, le groupe attribué (DTC normal / conditionnel / pathologique) aurait été différent s'il avait été estimé selon le 2^{ème} DTC plutôt que selon le 1^{er} pour 38% des patients (9). De la même manière, dans l'étude STOP I, 15% des enfants avec DTC pathologique ont eu un DTC de contrôle normalisé avant la randomisation (4). C'est la raison pour laquelle il est fréquemment réalisé assez rapidement un deuxième doppler en cas de vitesse >200cm/s avant de décider de débiter un programme transfusionnel, même si ce 2^{ème} examen ne fait plus partie des recommandations systématiques. Dans notre pratique, si le DTC est pathologique en dehors de circonstances favorisant (fièvre, anémie aiguë, douleur...), il n'est pas réalisé de contrôle avant la décision thérapeutique.

c. Le DTC : gold standard pour le dépistage et le diagnostic de vasculopathie cérébrale chez l'enfant drépanocytaire

Malgré les limites évoquées ci-dessus, le DTC reste la technique de référence pour dépister et diagnostiquer une vasculopathie cérébrale chez l'enfant drépanocytaire. Comme détaillé dans notre article de mise au point, les enfants avec une TAMMV >200cm/sec dans la carotide interne distale ou l'artère cérébrale moyenne proximale ont un risque d'infarctus cérébral 10 à 20 fois supérieur à celui de l'ensemble des enfants drépanocytaires du même âge, soit de presque 40 à 50% dans les 3 ans (3). Les enfants avec doppler pathologique ont un risque supérieur d'infarctus cérébral que ceux avec doppler conditionnel ou normal et ceux avec doppler conditionnel ont un risque plus élevé que ceux avec doppler normal (10).

Le DTC a ainsi une très bonne sensibilité pour détecter le risque d'infarctus cérébral (>94%), mais avec une spécificité moyenne (51%).

Malgré cette bonne sensibilité, si la majorité des enfants drépanocytaires présentant un infarctus cérébral ont eu au moins un doppler pathologique, l'analyse des données de STOP a montré que 19% des enfants avec accident vasculaire cérébral n'ont jamais eu de doppler pathologique ni même conditionnel (10). Ainsi, un DTC normal n'est pas une garantie de ne pas faire d'AVC.

Aujourd'hui, le risque individuel est estimé à partir de critères de groupes. En effet, la stratification est proposée indépendamment du taux d'hémoglobine du patient et de son âge, dont on sait qu'ils influencent la vitesse. Elle se fait également indépendamment des valeurs de référence de vitesse du patient : certains patients ont plutôt des vitesses basses et d'autres sont plus près de la limite supérieure de leur classe. On ne sait donc pas actuellement estimer finement le risque en analysant des variations de vitesse pour un même patient. A l'échelle d'un groupe, il a été retrouvé une augmentation de 29,3% du risque d'AVC pour chaque augmentation de 10cm/s de la TAMMV mais ceci n'est pas applicable à l'échelle individuelle (3). Intuitivement, on devine que les vitesses les plus élevées sont les plus pathologiques, y compris au sein de groupes normaux ou conditionnels. C'est pourquoi, en supplément de la répartition des patients par classes de vitesse, nous avons choisi dans notre étude DYVA (présentée dans la partie B.I) de considérer également la vitesse comme une variable continue.

2. Anatomicopathologie de la vasculopathie drépanocytaire, corrélats radiologiques et lien avec les autres atteintes vasculaires d'organes

Le cerveau présente la particularité d'être le seul organe dans la drépanocytose ayant à la fois une atteinte des gros et des petits vaisseaux. Les atteintes des autres organes sont uniquement liées à des atteintes microvasculaires.

a. Lésions vasculaires cérébrales dans la drépanocytose

L'atteinte des gros vaisseaux est responsable d'une vasculopathie proliférative, décrite dès les études anatomopathologiques des années 1970 (11). Au niveau cérébral et cervical, est décrite une atteinte des carotides internes et de leurs branches, avec hyperplasie intimale pouvant conduire à une sténose de la lumière, hyperplasie musculaire lisse, fragmentation de la limitante élastique, fibrose et thrombose in situ (12)

(figure 3). Il est souvent considéré que les lésions et le comportement de la vasculopathie drépanocytaire se rapprochent de ceux de l'athérosclérose, notamment par les signes inflammatoires, les éléments de dysfonction endothéliale (13). Cette vasculopathie cérébrale des gros vaisseaux touche de manière quasi-exclusive la circulation antérieure, provenant des carotides internes. Cette atteinte a été la plus étudiée car la plus facile d'accès en termes d'imagerie.



Figure 3 : Vasculopathie cérébrale drépanocytaire : coupe histologique d'une grosse artère cérébrale

On observe la prolifération intimale, les modifications de la limitante élastique et l'hyperplasie des cellules musculaires lisses.

Tiré de Pegelow, Arch Neurol 2001(14)

L'atteinte des petits vaisseaux cérébraux est un pôle d'intérêt plus récent, résultant des travaux concernant les infarctus silencieux. Sa physiopathologie et le type de lésions sont supposés comparables aux atteintes des petites artères périphériques, bien

connues dans la drépanocytose. En particulier, l'atteinte des artérioles pulmonaires est bien décrite. Dans la drépanocytose, elle est attribuée à des modifications de la voie métabolique du NO liées l'hémolyse (cf supra), entraînant une vasoconstriction chronique avec hypertension artérielle pulmonaire. Puis apparaissent des lésions prolifératives de la paroi vasculaire pulmonaire, hyperplasiques plexiformes et concentriques au niveau de la media, s'accompagnant de l'expression de molécules d'adhésion. La lumière vasculaire va ainsi progressivement s'obstruer par une thrombose in situ et l'hyperplasie pariétale (15,16) (figure 4). La physiopathologie de l'atteinte des petits vaisseaux rénaux est comparable, réalisant une glomérulopathie d'origine vasculaire (17). L'hyperdébit lié à l'anémie participerait également aux lésions. De plus, l'hypercoagulabilité favorise la thrombose des microvaisseaux, comme cela a été montré dans les petits vaisseaux cérébraux dans un modèle murin (16) et en association aux infarctus silencieux chez l'enfant drépanocytaire (18).

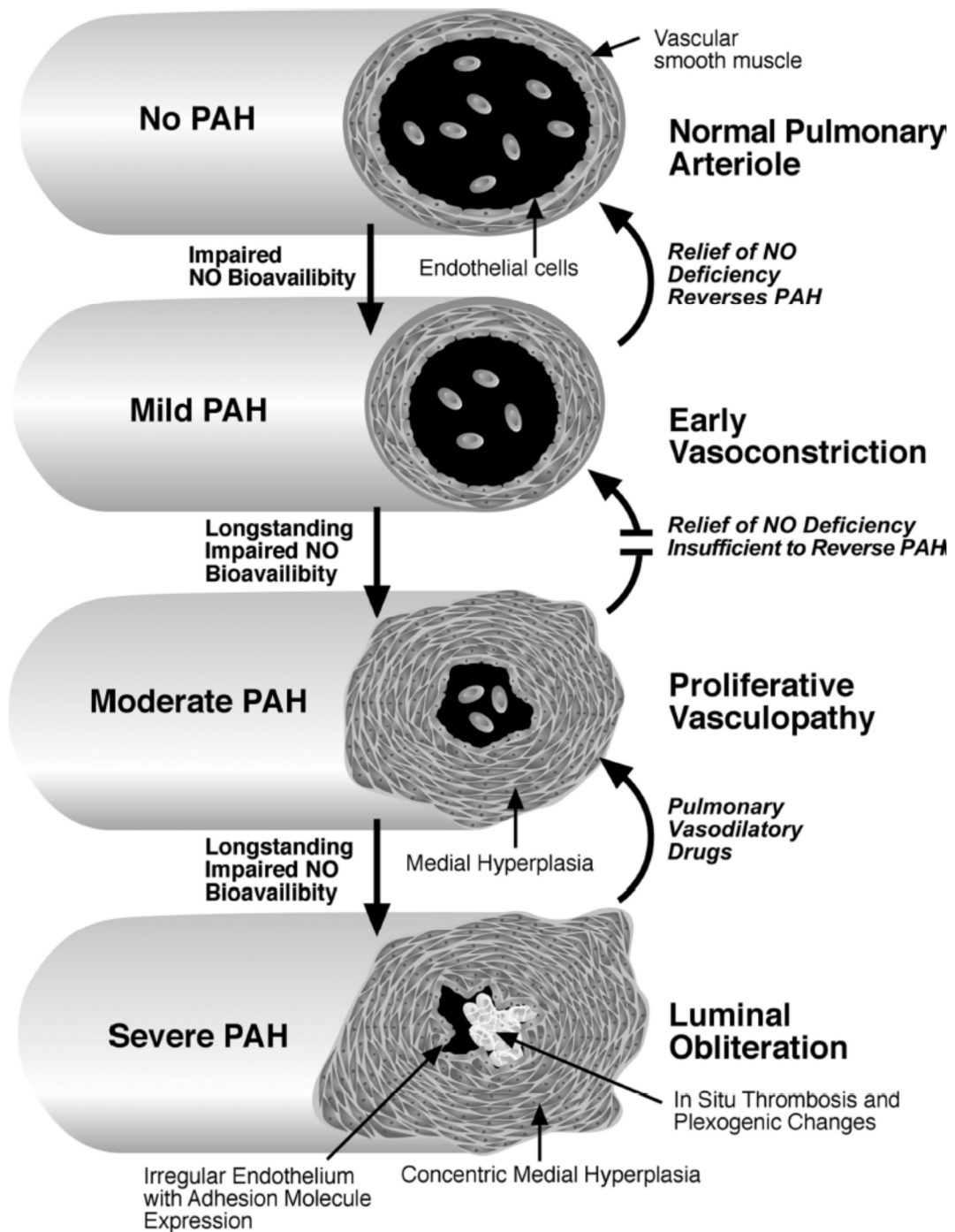


Figure 4 : Modèle proposé pour la progression des lésions des microvaisseaux pulmonaires dans la drépanocytose.

La physiopathologie de l'atteinte microvasculaire cérébrale est supposée comparable.

Tiré de Kato, *Pediatr Hematol Oncol* 2007 (15)

Le lien entre atteinte des gros et des petits vaisseaux a été évoqué à travers l'hypothèse de l'occlusion de *vasa vasorum*, c'est-à-dire de l'ischémie de la paroi des grosses artères par occlusion de leurs petites artères nourricières. Cette hypothèse est surtout évoquée

dans les organes périphériques mais plus discutée au niveau des vaisseaux du polygone de Willis. L'atteinte directe de l'endothélium est plutôt évoquée comme mécanisme principal pour les grosses artères.

b. Visualisation des lésions en imagerie

En imagerie, il est possible d'observer directement les lésions anatomiques des gros vaisseaux cérébraux au moyen d'outils angiographiques (angiographie conventionnelle ou par résonance magnétique). On peut également observer les lésions parenchymateuses ou d'autres éléments indirects consécutifs aux lésions ou modifications hémodynamiques de ces gros vaisseaux en IRM (flux lents). Pour l'atteinte des petits vaisseaux, on ne peut visualiser en imagerie que son retentissement sur le parenchyme cérébral car, compte tenu de leur diamètre, ils ne sont pas accessibles avec les techniques actuelles.

Les **grosses artères cérébrales** (polygone de Willis et ses branches) présentent des sténoses plus ou moins sévères. En général, il s'agit de sténoses proximales des branches carotidiennes (artère cérébrale antérieure ou artère cérébrale moyenne) et/ou de sténoses de la terminaison carotidienne. Des sténoses de l'artère carotide interne dans sa portion cervicale peuvent être également observées. Elles ont également été associées à des infarctus cérébraux symptomatiques (19). L'observation de flux lents en FLAIR (hyperintensités vasculaires des fonds des sillons) montre de manière indirecte les conséquences des anomalies anatomiques. Les résultats de l'angio-IRM ne sont pas strictement corrélés à ceux du doppler transcrânien, qui est plus sensible pour le diagnostic de vasculopathie cérébrale et permet un diagnostic plus précoce, notamment chez l'enfant (8,20,21). Ils fournissent cependant des indications sur la gravité de l'atteinte vasculaire en termes pronostiques : par exemple, les sténoses serrées visibles en angio-IRM sont plus souvent associées à des infarctus symptomatiques ou à une non-amélioration du TCD sous programme transfusionnel (20).

Les **lésions parenchymateuses** observées sont des lésions de leucoencéphalopathie vasculaire et infarctus silencieux et/ou des infarctus symptomatiques. Les infarctus silencieux sont définis dans la littérature par des hypersignaux T2 de plus de 3mm de grand axe sans retentissement clinique aigu observé et dont 90% concernent uniquement la substance blanche. Ils sont présents chez 30% des patients de moins de 6 ans (22). Ces lésions sont relativement proches de celles observées chez l'adulte en cas de leucoencéphalopathie vasculaire liée à l'âge, l'hypertension artérielle, etc.

Comme elles, les infarctus silencieux sont associés à des difficultés cognitives (le terme silencieux est donc stricto sensu inapproprié) et sont prédictifs de la survenue d'un infarctus cérébral symptomatique. Leur présence est en effet un facteur de risque indépendant d'infarctus cérébral symptomatique, avec une incidence multipliée par 14 pour 100 patients-année de suivi. Ceci correspond au risque d'infarctus pour les patients avec TCD conditionnel, tel qu'il a été évalué dans l'étude STOP (23).

Voir figure 2 de l'article 1 : Aspects en imagerie par résonance magnétique (IRM) des lésions vasculaires cérébrales et parenchymateuses dans la drépanocytose

- c. Atteintes des autres vaisseaux et lien avec la vasculopathie cérébrale drépanocytaire

Atteinte carotidienne extra-crânienne

De manière logique, l'atteinte des carotides au cou a été étudiée dans l'optique de vérifier si elle est liée aux accidents vasculaires cérébraux chez les enfants drépanocytaires. Il s'agit également d'une atteinte des gros vaisseaux. Des doppler cervicaux ont été pratiqués chez 236 enfants drépanocytaires, en même temps que leur DTC et des anomalies ont été relativement fréquemment retrouvées. Des tortuosités carotidiennes ont ainsi été observées chez 5,9% d'entre eux, des sténoses ou occlusion carotidiennes chez 5,4% (19). Dans cette étude, les tortuosités carotidiennes n'étaient pas corrélées à une histoire d'infarctus cérébral. En revanche, des sténoses ou occlusion carotidiennes étaient fortement associées à un infarctus cérébral clinique. Elles pourraient rendre compte de quelques situations d'infarctus cérébral avec imagerie vasculaire cérébrale normale (19). Les facteurs associés à ces anomalies artérielles cervicales et la chronologie de leur développement à l'âge pédiatrique n'ont pas encore été étudiés. L'étude des carotides au cou fait maintenant partie de l'exploration DTC des enfants drépanocytaires dans la plupart des centres. Toutefois, le seuil pathologique et la décision thérapeutique à prendre dans cette situation sont encore débattus.

Hypertension artérielle pulmonaire du drépanocytaire

Une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est fréquente chez l'adulte drépanocytaire car présente chez environ 1/3 des adultes selon des critères échocardiographiques. En routine, l'estimation de la pression artérielle pulmonaire se fait au moyen de l'échocardiographie par mesure de la vélocité de l'insuffisance tricuspide (ou TRV : Tricuspid Regurgitant Jet Velocity). L'hypertension artérielle pulmonaire est définie par une TRV supérieure ou égale à 2.5m/s. L'acuité de l'échocardiographie a été remise en question et la seule technique à ce jour qui reste validée est le cathétérisme cardiaque invasif, même si toutes les publications utilisent la TRV. Il semblerait néanmoins que la proportion d'HTAP soit nettement moindre chez les patients drépanocytaires si le diagnostic est fait par cathétérisme cardiaque invasif.

L'HTAP, pathologie pulmonaire microvasculaire (cf supra), représente un facteur de risque majeur de mortalité chez l'adulte (15) alors qu'elle ne l'est pas chez l'enfant, où la prévalence est beaucoup plus faible. Les facteurs qui sont épidémiologiquement liés à l'HTAP chez l'adulte drépanocytaire sont l'âge (augmenté), une hémolyse importante (hémoglobine basse, LDH élevés, bilirubine directe élevée, phosphatases alcalines augmentées), une atteinte rénale associée (créatinine augmentée, présence d'une protéinurie), un syndrome inflammatoire (ferritine augmentée), des stigmates de diminution de biodisponibilité du NO (ratio arginine / ornithine <0.7) ou une hypertension artérielle systémique. On observe donc des facteurs de risque communs avec la vasculopathie cérébrale, même s'il s'agit schématiquement d'une atteinte macrovasculaire pour le cerveau, microvasculaire pour le poumon, d'une atteinte de l'enfant jeune (1^{ère} décennie) pour le cerveau, de l'adulte et qui augmente avec l'âge pour le poumon. Une corrélation entre HTAP et accidents cérébrovasculaires symptomatiques, avec pour point commun physiopathologique la dysfonction endothéliale liée à la diminution de biodisponibilité du NO, a été montrée, sans réelle corrélation entre HTAP et résultat du doppler transcrânien (24,25).

Néphropathie vasculaire drépanocytaire

Une glomérulopathie ischémique chronique est décrite chez les patients drépanocytaires homozygotes. Sa physiopathologie n'est pas parfaitement comprise et mettrait en jeu un infarctissement de la médulla par obstruction des vasa recta, provoquant la libération de substances vasodilatatrices. L'hyperfiltration glomérulaire qui en résulte et qui est

majorée par l'hyperdébit cardiaque lié à l'anémie chronique va entraîner des lésions rénales et l'apparition d'une microalbuminurie. Puis apparaît la glomérulosclérose et l'altération de la fonction rénale. L'altération du pouvoir de concentration des urines apparaît précocement (avant l'âge d'un an) et la prévalence de la glomérulopathie augmente avec l'âge (jusqu'à 15% à 30% des enfants drépanocytaires ont une microalbuminurie pathologique). Il s'agit donc là aussi d'une pathologie de l'adolescent ou de l'adulte, alors que la vasculopathie cérébrale est symptomatique dès la première décennie. L'association entre glomérulopathie et accident vasculaire cérébral a été évoquée mais la corrélation au TCD n'a pas été étudiée en tant que telle (26).

Une fois encore, une corrélation entre anémie, marqueurs d'hémolyse, marqueurs du métabolisme du NO et glomérulopathie drépanocytaire a été mise en évidence (27). Une corrélation a été retrouvée entre microalbuminurie et hypertension artérielle pulmonaire, suggérant des facteurs physiopathologiques communs (28). D'autres marqueurs ont été associés à la glomérulopathie drépanocytaire : le taux de VEGF et de ses récepteurs solubles (dont la soluble fms-like tyrosine kinase 1 sFLT-1), qui jouent un rôle dans le développement glomérulaire et la barrière de filtration, et qui sont associés à une glomérulopathie (29).

3. Le traitement par hydroxyurée / hydroxycarbamide

Effets biologiques

L'hydroxyurée (Hydrea®) ou hydroxycarbamide (Siklos®) (HU) est une molécule de la classe des antimétabolites, principalement indiquée dans les syndromes myéloprolifératifs. Cette molécule agit sur la ribonucléotide réductase, l'enzyme clé de la transformation des quatre ribonucléotides en désoxyribonucléotides essentiels à la synthèse de l'ADN. Elle présente en outre des caractéristiques intéressantes pour le traitement de la drépanocytose : réactivation de la synthèse d'hémoglobine fœtale (HbF) qui limite la croissance du polymère d'hémoglobine S, réduction de l'adhésion des érythrocytes et des leucocytes à l'endothélium activé, action vasodilatatrice (donneur de NO) (30,31). L'augmentation de l'HbF est corrélée avec une diminution de marqueurs de la coagulation (FVIII, D-dimères) et d'activation endothéliale (sP-sélectine et VWF). Ces éléments sont en faveur d'un effet possible d'un traitement par HU pour diminuer

l'hypercoagulabilité chez les enfants drépanocytaires, comme chez les adultes (18,32). Par ailleurs, il existe une diminution de l'adhésion plaquettaire au fibrinogène sous HU (33). Plusieurs publications ont étudié l'ADN libre (cell-free DNA) mesuré par PCR, qui peut circuler sous forme de nucléosome. L'ADN libre est élevé chez les drépanocytaires, sans qu'ait été montré un lien avec la sévérité clinique, et son taux circulant est diminué par le traitement par HU (34). L'albuminurie est également diminuée sous traitement par HU (27). Enfin, la saturation artérielle en oxygène est également améliorée sous traitement par HU chez les drépanocytaires (35).

Intérêt clinique

Ces données biologiques intéressantes ont incité à évaluer l'effet clinique du traitement par HU chez les patients drépanocytaires. Outre son effet sur la réduction des événements vaso-occlusifs, il a été montré qu'en l'absence d'infarctus cérébral, cette molécule diminuait les vitesses au DTC, quelles que soient leurs valeurs (36). Cependant, elle ne suffit pas pour la prévention de la récurrence d'AVC chez les enfants drépanocytaires. Un essai de grande envergure, SWiTCH (Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea), a en effet été mené chez des enfants drépanocytaires ayant présenté un infarctus cérébral et ayant une hémochromatose liée au programme transfusionnel, en faisant le relais par HU. Cette étude a dû être interrompue devant le nombre important de récurrence d'infarctus cérébraux sous HU (7/67 soit 10 % dans le bras HU versus 0 dans le bras poursuite des transfusions (37). L'hydroxyurée garde donc un intérêt pour la réduire la fréquence et l'intensité des événements vaso-occlusifs lorsqu'ils sont fréquents et est facilement prescrite chez les enfants présentant un profil hémolytique sévère ou un DTC conditionnel.

II. La vasculopathie cérébrale drépanocytaire : composants physiopathologiques, éléments biologiques et de mécanique artérielle associés

Dans la drépanocytose, plusieurs éléments physiopathologiques et mécaniques sont impliqués dans la survenue d'événements vaso-occlusifs périphériques dont l'altération de la déformabilité érythrocytaire, des anomalies des propriétés d'adhésion des érythrocytes, une prolifération intimale, une activation latente de la coagulation. De même, les lésions vasculaires cérébrales dans la drépanocytose sont expliquées par la combinaison de l'hémolyse chronique et ses conséquences sur la paroi artérielle, d'une hypercoagulabilité et d'une activation des cellules sanguines et endothéliales. Pour certains auteurs, la chronicité de ces différents mécanismes aggrave progressivement les lésions et le terme de « cercle vicieux » drépanocytaire a été employé pour décrire la progression dans le temps de l'atteinte vasculaire (38).

1. Hémolyse chronique et ses conséquences hémodynamiques : le retentissement artériel (anatomique et fonctionnel)

Plusieurs études chez des enfants drépanocytaires ont montré une association entre hémolyse et augmentation des vitesses au DTC, c'est-à-dire un risque cérébrovasculaire qui augmente avec la sévérité de l'hémolyse. Le mécanisme supposé tient à la fois à l'augmentation du débit cardiaque et par conséquent du débit sanguin cérébral liée à l'anémie, mais aussi aux conséquences de l'hémolyse elle-même en termes de lésions de la paroi endothéliale, d'activation des cascades de coagulation, d'inflammation et d'activation cellulaire. L'augmentation des contraintes hémodynamiques globales est probablement également un facteur d'aggravation des lésions vasculaires endothéliales, qui aboutissent à un rétrécissement progressif du calibre artériel.

a. Marqueurs d'hémolyse associés à la vasculopathie cérébrale drépanocytaire

L'intensité de l'hémolyse et la sévérité de l'anémie en résultant sont des facteurs de gravité de la maladie drépanocytaire et notamment des facteurs associés au risque cérébrovasculaire chez l'enfant drépanocytaire. Le taux d'hémoglobine (Hb), des réticulocytes, de l'haptoglobine, mais également la bilirubine libre et les transaminases sont des paramètres classiques reflétant l'hémolyse intra-vasculaire. L'élévation de la LDH, elle aussi reflet de l'hémolyse, a été corrélée à la dysfonction endothéliale en général. Ainsi, l'augmentation de la LDH et la diminution du taux d'hémoglobine de base (avec élévation des réticulocytes) ont été corrélées à l'HTAP et aux valeurs du DTC (39,40). Dans une étude récente reprenant des données biologiques de 354 nourrissons de la CSSD (Cooperative Study of Sickle Cell Disease), un taux élevé de réticulocytes dans les 6 premiers mois de vie a été associé à la survenue d'accident vasculaire cérébral et de décès dans l'enfance et s'est révélé un meilleur marqueur que le taux d'hémoglobine lui-même (41). Il s'agit de patients « historiques » dont la prise en charge ne comportait pas toujours le dépistage au TCD, l'antibiothérapie prophylactique et les transfusions. Dans une série brésilienne plus récente et de prise en charge plus conforme aux recommandations actuelles, les réticulocytes étaient également un meilleur facteur prédictif de DTC anormal en analyse multivariée (42).

Un score biologique a été proposé pour prédire les DTC>170cm/s, associant l'âge et des marqueurs d'hémolyse (hémoglobine et transaminases) : $TAMMV$ (paramètre de vitesse utilisé dans le DTC de la drépanocytose) = $220 - (8 \times Hb) - (1,4 \times \text{âge}) + (0,4 \times ASAT)$. En utilisant le score, tous les DTC>170cm/s ont été détectés sur une série de 44 enfants, avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 58% (43). Cependant, ce score n'a pas été depuis réutilisé dans les études publiées ultérieurement et n'est pas utilisé en pratique quotidienne dans les pays développés. Il pourrait trouver une utilité dans les pays ne disposant pas d'un accès facile au DTC.

b. Pourquoi l'hémolyse induit-elle des lésions vasculaires dans la drépanocytose ?

Les mécanismes proposés des lésions vasculaires liées à l'hémolyse dans la drépanocytose reposent sur l'hypothèse des conséquences liées à une augmentation de l'adhésion des cellules à l'endothélium vasculaire et ses conséquences. D'une part, il a été montré que les érythrocytes et réticulocytes circulants expriment à leur surface des marqueurs membranaires d'adhésion à l'endothélium, qui peuvent jouer un rôle

dans la constitution des lésions artérielles ou d'organe (44). D'autre part, le rôle du monoxyde d'azote (NO) a été invoqué, notamment une diminution de sa production et de sa biodisponibilité. Le NO est en effet un puissant vasodilatateur circulant, régulateur de l'homéostasie vasculaire. Ses différents rôles suggèrent qu'il est sans doute un acteur clé des différentes atteintes vasculaires dans la drépanocytose. En effet, il diminue l'activation plaquettaire et l'expression des récepteurs d'adhésion sur l'endothélium vasculaire (molécules d'adhésion VCAM-1, E-sélectine, vasoconstricteurs comme l'endothéline-1), il réduit la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, limite les lésions d'ischémie-reperfusion, module la prolifération endothéliale et régule l'inflammation. Il réagit avec l'hémoglobine libre relarguée du fait de l'hémolyse, aboutissant à la production de radicaux libres oxydatifs (ROS). Dans la drépanocytose, bien que l'expression et l'activité de la NO synthase soient augmentées, on observe un état de résistance au NO, d'inactivation du NO et d'une diminution de sa biodisponibilité. Il a été montré que les érythrocytes drépanocytaires ont un déficit de présentation membranaire du NO et leur capacité d'induire une vasodilatation en conditions hypoxiques est également réduite (45). Ainsi, en condition d'hémolyse accrue, d'inflammation, de stress oxydatif, la régulation positive compensatoire du NO devient donc potentiellement inefficace.

La diminution du NO peut être mesurée de manière indirecte par le rapport plasmatique arginine/ornithine. Le relargage d'arginase érythrocytaire dû à l'hémolyse oriente en effet le métabolisme de l'arginine vers la production d'ornithine. La diminution du rapport arginine/ornithine reflète une augmentation de l'activité arginase plasmatique. Chez l'enfant drépanocytaire en conditions basales, le taux d'arginine est normal, alors qu'il est diminué chez l'adulte drépanocytaire (46–48). Avec d'autres techniques approchant la mesure du NO, une diminution du taux de NO circulant a été rapportée chez des enfants drépanocytaires par rapport aux témoins (18).

Les modifications anatomopathologiques résultant de la combinaison de l'agression endothéliale chronique et des modifications des propriétés mécaniques de la paroi ont été détaillées dans la partie A.I.2. (cf supra).

c. Mesure du retentissement sur la mécanique artérielle

La mécanique artérielle est altérée par ces modifications biochimiques et anatomopathologiques chroniques, avec notamment une capacité de vasodilatation diminuée et une rigidité artérielle. Ces mesures se font au niveau périphérique ou de la carotide interne. Par analogie, on peut penser que ces modifications sont au moins en partie comparables dans la circulation cérébrale.

Mesure de la capacité de vasodilatation endothélium-dépendante : on l'évalue par la technique de la FMD (Flow-Mediated Dilation). Cette technique ultrasonore validée, non invasive, consiste en la mesure échographique des modifications de calibre de l'artère brachiale en réponse à une hyperhémie réactionnelle (modifications de flux). Cette vasodilatation est médiée par le NO. On la compare à la vasodilatation non endothéliale-dépendante (NED Non Endothelial Dependent vasodilation), qui mesure les changements artériels en réponse à l'administration d'une dose sublinguale de nitroglycérine (trinitrine) et qui reflète essentiellement la réponse musculaire lisse. Une FMD et une NED diminuées sont des facteurs de risque forts d'événements cardiovasculaires chez l'adulte (49). Des normes ont été estimées chez l'enfant (peak FMD 7.7 +/- 4%) (50). Il a été montré que la capacité de vasodilatation endothélium-dépendante est diminuée chez les patients drépanocytaires adultes et pédiatriques à l'état stable, reflet d'une dysfonction endothéliale débutant dès l'enfance, la réponse à des donneurs de NO exogènes restant conservée (51–53). Ces anomalies sont précoces et chroniques, elles ne se majorent pas lors des crises vaso-occlusives dans le groupe d'adultes drépanocytaires étudié. Par contre, l'altération des capacités de vasodilatation non médiées par l'endothélium est retrouvée uniquement chez les adultes drépanocytaires (51,52). Des résultats concordants ont été retrouvés avec une autre technique assez comparable en mesurant l'index de réactivité hyperhémique (tonométrie artérielle périphérique) (54). Une corrélation éventuelle entre atteinte endothéliale périphérique mesurée par FMD ou tonométrie artérielle et vasculopathie cérébrale n'a pas été recherchée.

Mesure de la rigidité artérielle (Arterial stiffness) : C'est une autre technique non invasive d'exploration fonctionnelle artérielle. Elle repose sur les propriétés anatomiques et leurs conséquences fonctionnelles des artères : les artères les plus centrales ont une élasticité importante, du fait d'un ratio élastine/collagène élevé, qui diminue quand on va vers la périphérie alors qu'augmente le rôle des cellules musculaires lisses dans le tonus artériel. On mesure les paramètres suivants : compliance et distensibilité. La distensibilité (inverse de la rigidité) est définie comme le pourcentage de variation d'une

section artérielle en fonction de la variation de pression sanguine dans cette zone, c'est-à-dire qu'elle décrit l'augmentation de diamètre artériel en l'exprimant comme un pourcentage du diamètre artériel initial en fonction de la force qui cause cette expansion (pression transmurale) (50). La rigidité artérielle (arterial stiffness) est un facteur prédictif important de complications cardiovasculaires chez l'adulte. Une perte de souplesse de la paroi artérielle a pour conséquence un accroissement marqué de la pression artérielle systolique. Le lit vasculaire distal est alors soumis à une pression pulsatile anormalement élevée, ce qui accélère son vieillissement, donc sa sclérose. Chez l'enfant, c'est un facteur prédictif de complications cardiovasculaires à l'âge adulte (50). La rigidité artérielle est augmentée chez les adultes drépanocytaires et associée aux infarctus cérébraux (55). Dans une étude réalisée dans notre centre, malgré un diamètre de carotide interne augmenté chez les enfants drépanocytaires, la rigidité et la distensibilité artérielle n'étaient pas différentes des contrôles, conduisant à l'hypothèse que le diamètre artériel était uniquement modifié par l'augmentation du débit sanguin (52).

Mesure de l'épaisseur intima-media (*intima-media thickness IMT*) : elle est réalisée au niveau de l'artère carotide commune (figure 5). Chez les adultes non drépanocytaires, l'augmentation de l'IMT a montré une association avec le risque cardio-vasculaire : infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral hors drépanocytose (méta-analyse) (56). Une étude publiée chez des adultes drépanocytaires n'a pas montré d'augmentation de l'IMT (55). Chez les enfants drépanocytaires, elle a été retrouvée comparable aux témoins (52).

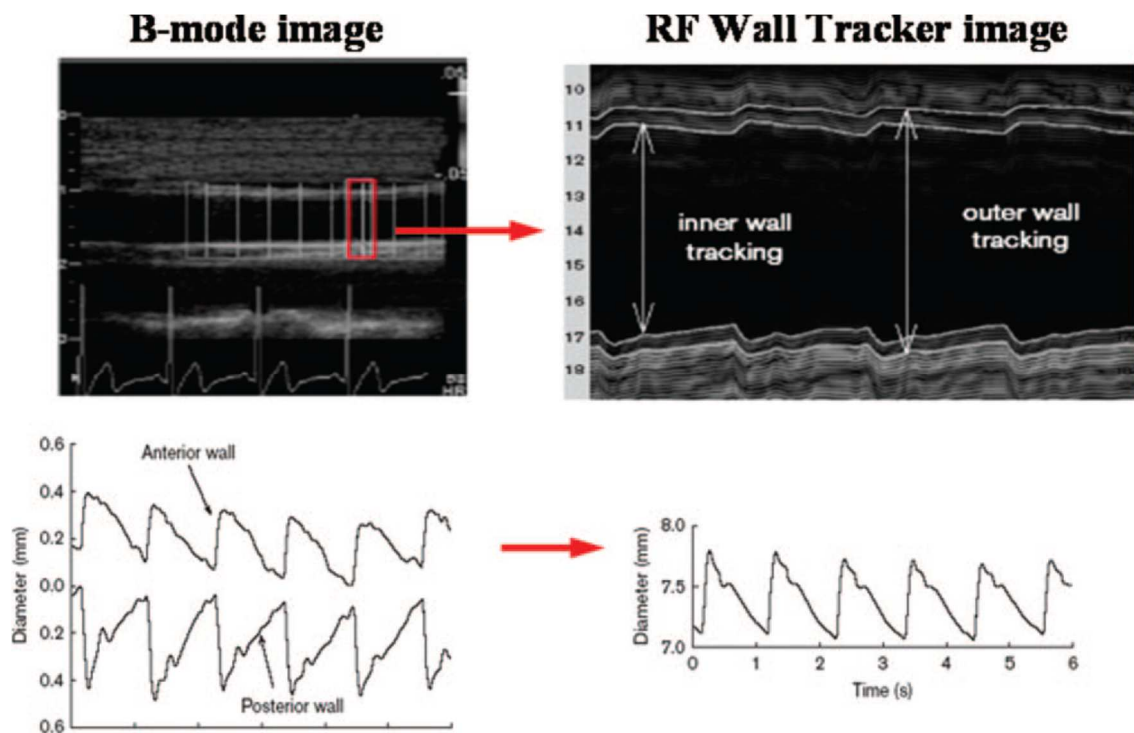


Figure 5 : Imagerie vasculaire échographique et calcul de l'épaisseur intima-media
Tiré de Urbina, Hypertension 2009 (50)

2. Profil de coagulation des adultes d'origine africaine

Les syndromes drépanocytaires majeurs touchent des sujets d'origine africaine, antillaise, ou de l'océan Indien. Pour bien interpréter les données concernant les patients drépanocytaires, il est donc important au préalable de souligner les particularités du profil de coagulation des patients d'origine africaine non drépanocytaires, et donc liées à l'origine ethnique.

Les accidents vasculaires cérébraux étant plus fréquents et survenant à un âge plus jeune chez les sujets noirs (d'origine africaine et Afro-Caraïbes), la question d'une fréquence augmentée de thrombophilie a été posée dans cette population et des études concernant les variations des paramètres de coagulation en fonction de l'origine ethnique sont donc disponibles dans la littérature. Leur analyse a permis tout d'abord de noter que les normes des différents tests de coagulation ont été établies dans des populations majoritairement caucasiennes alors qu'il existe des particularités du profil de coagulation chez les adultes d'origine africaine. Il n'y a quasiment pas de données disponibles chez l'enfant d'origine africaine, raison pour laquelle nous avons finalement

inclus des enfants témoins de même origine ethnique que les enfants drépanocytaires dans notre étude.

Les valeurs de **facteur VIII** sont plus élevées chez les sujets noirs : dans la série de Patel, la valeur normale supérieure habituelle (90^{ème} percentile) de 150 UI/dL (soit 150%), établie dans une population majoritairement caucasienne (étude Leiden) est dépassée chez 38% des sujets noirs (contre 10% par définition dans la population contrôle), chez qui la valeur normale supérieure a ainsi été évaluée à 228 UI/dL. L'élévation du facteur VIII au-dessus de cette normale supérieure est un facteur de risque de thrombose veineuse (OR 4.64), qui est encore majoré lorsqu'est utilisé le seuil classique (OR 11,1), suggérant de plus une relation entre le taux de FVIII et le risque de thrombose (57). Une des explications peut être la prévalence supérieure chez les sujets d'origine africaine de groupes sanguins non-O, associés à des taux supérieurs de VWF et par conséquent de FVIII (58). Cette augmentation du VWF et du FVIII est également retrouvée chez les femmes et chez les sujets adultes les plus âgés (59).

Les taux de **protéine S** et de **protéine C** sont significativement inférieurs chez les contrôles d'origine africaine comparés aux caucasiens, mais pour l'antithrombine la tendance n'est pas significative. Le temps de venin de vipère Russell dilué (DRVVT, utilisé pour le dépistage des anticoagulants lupiques) est plus long chez les sujets noirs que chez les sujets caucasiens. Ceci suggère que les fourchettes actuellement utilisées pour définir des facteurs de risque thrombophiliques sont à manier avec précaution chez les sujets noirs : une proportion significativement supérieure de sujets témoins noirs seraient ainsi classés déficitaires en protéine S, C » ou « avec anticoagulant de type lupique » en utilisant les normes des sujets caucasiens. En utilisant des normes définies par les résultats de la population témoin noire +/- 2DS, les sujets noirs avec accident vasculaire cérébral n'ont pas significativement plus de thrombophilie que les contrôles de même origine ethnique (60).

3. Profil prothrombotique et d'activation cellulaire chez l'adulte drépanocytaire et lien avec les accidents vasculaires cérébraux

Malgré les particularités ethniques, un profil particulier d'hypercoagulabilité a été mis en évidence chez l'adulte drépanocytaire et mieux défini que chez l'enfant. En revanche, l'étude du lien entre hypercoagulabilité, activation cellulaire et risque cérébrovasculaire a été mieux étudié chez l'enfant. Nous présentons dans ce paragraphe les caractéristiques biologiques d'hypercoagulabilité et d'activation cellulaire de l'adulte

drépanocytaire. Ils seront ensuite repris chez l'enfant et le lien avec la vasculopathie cérébrale sera étudié.

Un tableau récapitulatif reprend ces différents éléments (table 1, cf. infra).

a. Elévation des protéines de la coagulation et état pro-coagulant

Chez l'adulte drépanocytaire, a été rapporté depuis les années 1970 un profil hypercoagulable avec notamment des taux élevés de **facteur VIII** et des taux parfois élevés de fibrinogène (61–64).

Il existe également une augmentation de la proportion de larges multimères de VWF, pouvant se traduire par un état pro-thrombotique. Le VWF est un médiateur de l'adhésion plaquettaire. Il est sécrété sous formes hautement multimérisées hyper-adhésives par la cellule endothéliale activée, ces multimères de masse moléculaire élevée étant ensuite rapidement clivés par la métalloprotéinase ADAMTS13 dans le flux sanguin. Chez les patients drépanocytaires, l'augmentation des larges multimères de VWF a été corrélée au degré d'hémolyse mesuré par le taux de LDH (65).

L'état procoagulant du patient drépanocytaire est également objectivé par une élévation de la génération de thrombine, des taux de D-dimères, des complexes thrombine-antithrombine, des fragments 1+2 de la prothrombine (F1+2, marqueurs de l'activation de la prothrombine en thrombine) et ces anomalies sont corrélées à l'hémolyse (66–68). Il est à noter que les complexes thrombine-antithrombine et les fragments F1+2 de la prothrombine ne sont pas normalisés par les transfusions régulières. Une association entre D-dimères élevés et antécédent d'accident vasculaire cérébral a été retrouvée chez des patients adultes, dont aucun n'était sous programme transfusionnel. Pour les autres marqueurs, les résultats sont variables : les complexes thrombine-antithrombine ne seraient pas associés à la vasculopathie cérébrale mais ont pu être associés à la rétinopathie (67,69).

Plusieurs travaux ont analysé le taux de **facteur tissulaire (TF)** soluble chez le drépanocytaire. Le facteur tissulaire est un activateur majeur de la cascade de coagulation qui, en se liant au facteur VII activé, permet l'activation des facteurs de coagulation IX et X. Le facteur tissulaire est présent dans les cellules de la paroi vasculaire (essentiellement cellules musculaires lisses et fibroblastes), dans des monocytes circulants (en particulier après activation par un stimulus, par exemple le lipopolysaccharide LPS), dans des microparticules circulantes et dans la circulation sous son isoforme soluble (sTF). Le facteur tissulaire a également des propriétés de récepteur

transmembranaire (régulant des gènes impliqués dans la prolifération et migration cellulaires) et un rôle dans la prolifération vasculaire et tumorale. Des niveaux élevés de sTF ont été détectés chez des patients avec facteurs de risque cardiovasculaire, coronaropathie, cancer (70). Les taux de sTF sont également plus élevés chez les patients drépanocytaires comparés à des patients non drépanocytaires appariés pour l'âge et l'origine ethnique mais l'activité procoagulante liée au TF n'augmente pas en crise vaso-occlusive (64,71). Le rôle du TF sur la coagulation, mais aussi sur l'inflammation et les lésions endothéliales a été confirmé dans des modèles murins de drépanocytose, sans qu'ait été étudiée une éventuelle spécificité cérébrale (72).

Enfin, chez l'adulte drépanocytaire, il existe une diminution des protéines anticoagulantes (protéines C et S) et une activation anormale du système fibrinolytique résultant probablement de la coagulation en amont (élévation des D-dimères et des complexes plasmine-antiplasmine) (68).

b. Activation des plaquettes et des leucocytes

Une activation plaquettaire, au rôle important dans la formation du thrombus artériel, a été retrouvée à l'état basal chez l'adulte drépanocytaire. Ses marqueurs principaux sont la diminution du contenu plaquettaire en thrombospondine 1, une élévation des marqueurs d'adhésion plaquettaire (CD40 ligand, P-sélectine) et d'activation (exposition de phosphatidylsérine, etc). Une thrombocytose modérée avec augmentation des formes jeunes est fréquente chez les patients drépanocytaires (62). La caractérisation in vitro de plaquettes issues de patients drépanocytaires a montré qu'elles circulaient sous forme activée, avec des propriétés adhésives augmentées et pouvaient stimuler l'activation endothéliale. Elles avaient notamment une capacité de sécrétion augmentée pour l'IL-1 β , P-sélectine (CD62P), α IIb β 3 (73). Le CD40 ligand serait d'ailleurs associé à une augmentation de fréquence des CVO (67).

Les drépanocytaires présentent également une hyperleucocytose dont les causes semblent multiples : entraînement médullaire, inflammation, etc. L'hyperleucocytose ($>15.000/mm^3$) est un facteur de risque de mortalité, de syndrome thoracique aigu, d'hémorragie cérébrale et de crises vaso-occlusives chez les adultes drépanocytaires (74,75). Outre le nombre de leucocytes, c'est aussi leur activation et donc les produits qu'ils sécrètent, leurs propriétés adhésives (notamment via la P-sélectine et la E-sélectine circulantes ou membranaires) et les complexes qu'ils peuvent former avec

d'autres types cellulaires qui jouent un rôle important dans le risque vasculaire des drépanocytaires, comme cela a été montré dans un modèle murin (76).

Les amas ou complexes leuco-plaquettaires (ALP) sont formés par l'adhésion des plaquettes activées exprimant la P-sélectine (CD62P) avec les leucocytes via leur récepteur PSGL1. Les leucocytes concernés sont principalement les monocytes et les neutrophiles. Leur taux serait le reflet d'un état prothrombotique (77). Ils sont plus élevés dans les populations afro-américaines que dans les populations caucasiennes (26% en moyenne vs 14%) (78). Chez des patients drépanocytaires homozygotes de plus de 11 ans, le pourcentage d'ALP a été retrouvé significativement plus élevé (en moyenne 46%) que chez des patients contrôles adultes (78,79).

Depuis 2004, un rôle des polynucléaires neutrophiles dans les réactions inflammatoires et la thrombose a été décrit via la formation de NETs (neutrophil extracellular traps). Il s'agit d'un réseau de brins de chromatine (ADN extracellulaire) associés à des histones, des nucléosomes (octamères d'histones avec un fragment d'ADN) et à plusieurs protéases dérivées des neutrophiles, dont l'enzyme myéloperoxydase (MPO). La formation des NETs est facilitée par des stimuli infectieux ou inflammatoires. Les NETs ont un rôle bénéfique dans le piégeage et l'élimination des virus et bactéries, mais par ailleurs ils lient le FT et activent la voie intrinsèque de la coagulation, facilitent la thrombose et sont également toxiques pour les cellules endothéliales et parenchymateuses. Il semblerait que le rôle des NETs soit plus marqué dans la thrombose veineuse qu'artérielle (80–82). Chez des drépanocytaires adultes à l'état stable, les nucléosomes, marqueurs des NETs, sont plus élevés que chez les témoins de même origine ethnique (83). Dans un modèle murin, le rôle de l'hémoglobine libre dans la formation des NETs a été mis en évidence (84).

Coagulation/Platelet Parameter	Increased (↑) or Decreased (↓)
Prothrombin fragment 1.2	↑
Thrombin-antithrombin complex	↑
D-dimer	↑
Fibrinopeptide A	↑
Fibrin-fibrinogen fragment E	↑
Factor V	↓
Plasmin-antiplasmin	↑
Plasma β -thromboglobulin	↑
CD62P (P-selectin) expression	↑
Platelet thrombospondin content	↓
Platelet factor 4	↑
CD40 ligand	↑
Membrane binding of annexin V	↑

Table 1 : Modification des paramètres de coagulation et plaquettaires chez l'adulte drépanocytaire
Tiré de Ataga Am J Med 2003 (62)

c. Marqueurs d'activation endothéliale et de lésion endothéliale

Marqueurs de lésion / régénération endothéliale	Marqueurs d'activation / dysfonction endothéliale
CEC	CD34
VEGF	E sélectine
	P sélectine
	PDGF-AA, sVCAM1
	VWF sans signe d'inflammation
	FMD, IMT (cf infra)

Le renouvellement endothélial physiologique est lent et les **cellules endothéliales circulantes** (CEC) sont des événements rares dans le sang circulant de l'adulte sain. Le nombre de CEC est un reflet de lésions endothéliales étendues (infections, maladies cardiovasculaires, inflammatoires, transplantation, cancer) ou plus locales (infarctus du

myocarde, angioplastie) et de l'activité de certaines pathologies inflammatoires (figure 6). Les CEC semblent donc un marqueur intéressant de lésion endothéliale aiguë et chronique, notamment osseuse, viscérale, pulmonaire, sans spécificité d'un diamètre artériel. Un intérêt pronostique du nombre des CEC a été montré dans mon équipe d'accueil chez des patients non drépanocytaires mais porteurs de cardiopathie congénitale, avec hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), chez qui le taux de CEC était significativement plus élevé chez les patients avec HTAP irréversible que chez ceux dont l'HTAP était réversible (85).

Chez les drépanocytaires, il semblerait que les CEC soient majoritairement d'origine microvasculaire, car exprimant le CD36 (86). Une étude chez 18 drépanocytaires SS a montré une élévation des cellules endothéliales circulantes chez les patients à l'état stable et lors de la crise drépanocytaire par rapport à des témoins (adultes et pédiatriques sans spécification de leur origine ethnique). Cette augmentation restait très modérée : autour de 13 CEC/mL (SD 11) pour les drépanocytaires à l'état stable et autour de 23 CEC/mL (DS 18) pour les patients en crise vaso-occlusive, versus 2-3 CEC/mL pour les témoins, les drépanocytaires hétérozygotes ou les patients avec anémie d'autre origine. Ces CEC portaient des marqueurs d'activation et d'adhésion cellulaires (Intercellular Adhesion Molecule I-CAM1, Vascular Intercellular Adhesion Molecule V-CAM1, E-sélectine, P-sélectine). Ces données étaient comparables dans une autre étude (86,87). Une élévation significative, ou plutôt une dispersion du nombre de CEC, a été montrée en cas d'hypertension artérielle pulmonaire chez les adultes drépanocytaires mais la médiane reste dans les normes dans les différents groupes (87). Le lien entre CEC et atteinte vasculaire cérébrale drépanocytaire n'a pas été étudié. En dehors de la drépanocytose et chez l'adulte, les CEC ont été associées sur le plan cérébral à des altérations microvasculaires de la barrière hémato-encéphalique d'origine acquise (infectieuse ou toxique notamment) (88).

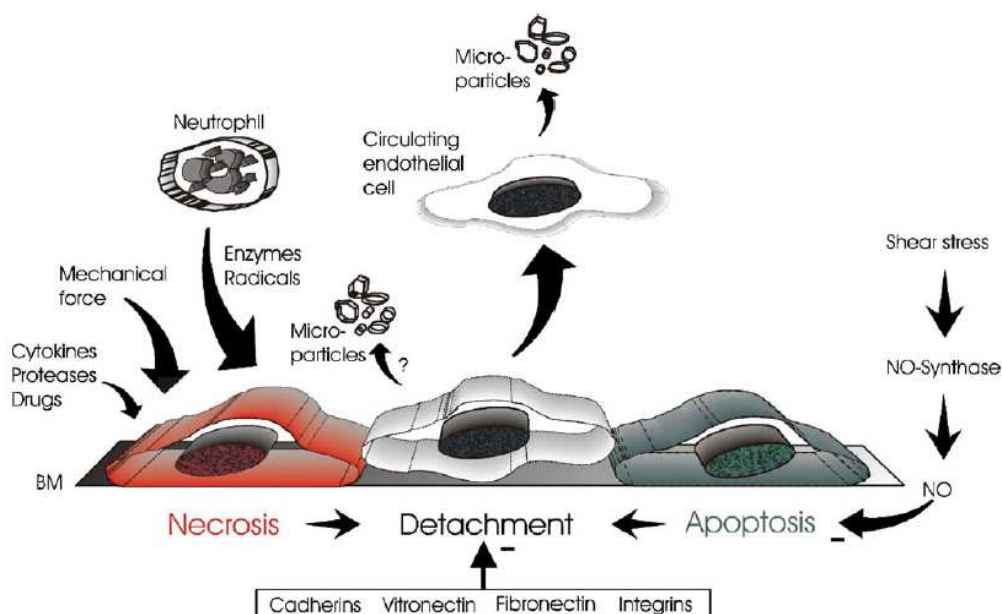


Fig. 3. Mechanisms of detachment of endothelial cells.

Figure 6 : Mécanismes de détachement des cellules endothéliales
Tiré de Erdbruegger Clinica, Chimica Acta 2006 (89)

Alors que les CEC sont des cellules matures provenant des vaisseaux, les progéniteurs endothéliaux (endothelial progenitor cells, EPC) proviennent de la moelle osseuse. Plusieurs types cellulaires ont été décrits, mais il s'agit typiquement de cellules CD34+ et exprimant le récepteur au facteur de croissance endothélial VEGF (VEGFR2), ayant probablement un précurseur commun hémato-endothélial. Ils expriment également un récepteur au Stem Cell Factor (CSF), le récepteur Kit, ainsi que le CD133 (marqueur d'immaturité cellulaire). Les EPC portent également le récepteur au Fibroblast Growth Factor FGF (89). En situation d'hémolyse chronique et donc d'entraînement médullaire, il existe une mobilisation chronique des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ totaux. Cependant, il n'a pas été trouvé de différence dans les taux de la population des EPC chez l'adulte drépanocytaire comparé aux témoins (90). Certains sous-types d'EPC étaient diminués, corrélés à la présence d'une hypertension artérielle pulmonaire et à une dysfonction vasculaire endothéliale mesurée en échographie vasculaire (91,92). Dans le cadre de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire, ces cellules n'ont pas été étudiées, ni comme marqueurs diagnostiques ni pronostiques.

Par ailleurs, les cellules endothéliales activées peuvent exprimer le facteur Willebrand, la thrombomoduline et la E-sélectine (89). Ces facteurs seront étudiés dans des paragraphes spécifiques.

- d. Conséquences de l'activation cellulaire : facteurs de croissance et d'adhésion, marqueurs d'activation endothéliale et d'adaptation tissulaire à l'ischémie

Les cellules endothéliales activées sécrètent le VWF et de nombreuses protéines, exposent les P- et E-sélectines, et libèrent de la thrombomoduline soluble (89).

La P-sélectine est une molécule d'adhésion de l'endothélium, stockée dans les corps de Weibel-Palade, et qui peut être rapidement transloquée à la surface de la cellule stimulée (et des plaquettes activées) (93). La P-sélectine existe également sous forme soluble (sP-sélectine). La P-sélectine joue un rôle multiple favorisant l'adhésion cellulaire, c'est un marqueur d'activation plaquettaire et leucocytaire d'origine endothéliale. Elle stimule l'adhésion des leucocytes, des érythrocytes, l'interaction plaquettes-leucocytes, favorisant ainsi le « rolling » et l'adhésion leucocytaire ou érythrocytaire (79,94). Elle a un rôle prothrombogène et pro-inflammatoire démontré dans la microcirculation cérébrale d'un modèle murin de drépanocytose (95). Comme elle agit à des stades très précoces de la vaso-occlusion, la P-sélectine représente une potentielle cible thérapeutique. Une étude de phase I chez des patients drépanocytaires a été menée avec le GMI-1070, inhibiteur des sélectines. La perfusion du produit a entraîné une diminution des taux sanguins de marqueurs d'activation endothéliale, d'activation leucocytaire et de coagulation (93,96). De même, un analogue héparinique, le pentosan polysulfate sodium (PPS) a montré dans des études de phase I et de phase II une amélioration de la microcirculation in vitro (94).

La E-sélectine est une molécule d'adhésion sécrétée par l'endothélium stimulé par des cytokines inflammatoires (73). Un des rôles des sélectines est de médier le « rolling » des leucocytes le long de l'endothélium, permettant leur ralentissement et l'induction d'une adhésion plus importante (93). En particulier, l'expression de la E-sélectine joue un rôle particulier dans l'adhésivité des leucocytes et des érythrocytes (96). Sous sa forme soluble, elle est plus élevée chez les drépanocytaires que chez les non drépanocytaires de même origine ethnique et elle semble davantage liée à l'inflammation qu'à l'activation de la coagulation (64). C'est un marqueur de sévérité de l'HTAP dans la drépanocytose, et est associé à la dysfonction rénale. Son taux est de manière indépendante associé au risque de mortalité dans une cohorte de drépanocytaires adultes (64,97). Elle représente donc également une cible thérapeutique pour le GMI-1070, inhibiteur des sélectines (93,96).

D'autres marqueurs d'activation endothéliale ont été largement étudiés chez les drépanocytaires. Il s'agit notamment de **sVCAM1 (soluble Vascular Adhesion Molecule)**, qui est augmenté chez les patients drépanocytaires, et davantage chez ceux qui présentent une HTAP (63).

Par ailleurs, le **PIGF (placenta growth factor)**, qui appartient à la famille des VEGF, est plus élevé chez les sujets drépanocytaires que chez des contrôles, et en particulier chez des drépanocytaires avec CVO fréquentes (98). Dans une autre étude chez les patients drépanocytaires, des taux élevés étaient significativement associés à la présence d'une hypertension artérielle pulmonaire, mais avec une valeur prédictive faible. Les taux de PIGF corrélaient aux marqueurs d'hémolyse (99).

Enfin, les patients drépanocytaires présentent une élévation des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires (notamment IL6, 8 et 10) et une diminution des taux de cytokines anti-inflammatoires (63,100).

e. Conséquences de l'activation cellulaire : les microparticules circulantes

L'externalisation à la membrane cellulaire de résidus phosphatidylsérine, en réaction à des stimuli divers (cycles de falciformation pour l'érythrocyte, activation cellulaire) semble être le point de départ d'une cascade de réactions conduisant à la formation de microparticules (MP) circulantes d'origine érythrocytaire, plaquettaire, leucocytaire ou endothéliale. Il s'agit de résidus vésiculaires de membrane plasmique, de 0.1 à 1µm de diamètre, qui contiennent des composés cytoplasmiques et des phospholipides. Les MP d'origine plaquettaire, riches en phosphatidylsérine, fournissent une surface procoagulante pour la génération de thrombine en stimulant l'activité prothrombinase, en liant le facteur V activé et le facteur VIII. Certaines contiennent du facteur tissulaire ou présentent en surface d'autres facteurs procoagulants tels que la E-sélectine. Ces MP semblent avoir un rôle de régulation de l'inflammation, de stimulation de la coagulation ; elles affectent les fonctions vasculaires et l'apoptose, elles peuvent également jouer un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaires (101). Elles sont élevées dans différentes pathologies thrombotiques et inflammatoires, dans des pathologies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde, l'hypertension artérielle, le syndrome coronarien aigu, l'athérosclérose, et représentent un marqueur de risque thrombotique dans certains cancers, etc. (102,103). Chez des patients non drépanocytaires avec AVC récent, un taux plus élevé de MP d'origine endothéliale positives pour CD62E (E-sélectine) a été rapporté, associé à un score NIHSS et une

surface d'infarctissement plus importants. Chez des patients non drépanocytaires avec facteurs de risque vasculaire, la proportion des sous-types de MP d'origine endothéliale était différente selon qu'ils présentaient des sténoses artérielles intra ou extra-crâniennes. Le profil phénotypique des MP d'origine endothéliale pourrait donc être considéré comme un marqueur du risque cérébrovasculaire (104). Dans la drépanocytose, les microparticules totales sont plus élevées que chez le non drépanocytaire (48,105). Chez ces patients, ont été d'abord décrites les MP d'origine érythrocytaire et plaquettaire, puis des MP d'origine leucocytaire (monocytes) et endothéliales (48,105). Le taux élevé de MP a été corrélée à l'état procoagulant du patient et à l'hémolyse, notamment pour certaines sous populations de MP d'origine endothéliale, exprimant ICAM1 y compris chez l'enfant (48,66,101,105–107).

4. Profil de coagulation et d'activation cellulaire en crise vaso-occlusive

La crise vaso-occlusive (CVO) est un phénomène d'occlusion microvasculaire par des thrombi. Les agrégats de plaquettes augmentent lors d'une CVO (108). On peut donc supposer une activation des phénomènes de coagulation, d'inflammation et d'activation cellulaire (micro-infarctus osseux ou d'organe, douleur). Quelques données sont effectivement disponibles, permettant de comparer les modifications du profil de coagulation et d'activation cellulaire chez des patients drépanocytaires en crise vaso-occlusive et à l'état stable.

Ainsi, il a été constaté, dans deux études ayant inclus respectivement 31 adultes et 20 enfants drépanocytaires SS, que la **génération de thrombine et le taux de D-dimères** augmentent significativement pendant une crise vaso-occlusive (71,109). L'**activation plaquettaire** est elle aussi stimulée : on observe une élévation du taux de thrombospondine 1 soluble, qui est sécrétée par les plaquettes activées. Elle module la réponse vasculaire à l'hypoxie, régule la vasoconstriction, inhibe l'angiogenèse, favorise l'adhésion des érythrocytes drépanocytaires à l'endothélium. Elle inhibe également la voie de signalisation du NO en se liant aux récepteurs CD36 et CD47 exprimés sur les cellules endothéliales et les plaquettes. Chez des patients drépanocytaires, son taux est élevé en CVO et corrèle aux antécédents de syndrome thoracique aigu, à l'utilisation d'hydroxyurée et à une hémolyse plus faible. C'est un des rares facteurs qui ne corrèle pas à l'hémolyse et qui donc serait donc un marqueur plus spécifique des phénomènes de viscosité-vaso-occlusion (110,111).

Chez la souris, un cycle d'hypoxie-réoxygénation augmentait les taux des **amas leucoplaquettaires**, suggérant une augmentation des ALP en crise vaso-occlusive ou en situation d'hypoxie-réoxygénation (79). Ces résultats semblent en corrélation avec les données cliniques : il a été montré qu'un syndrome thoracique aigu récent (l'exemple par excellence d'une agression de type hypoxie-réoxygénation) est un facteur de risque important de survenue d'infarctus cérébral (75). Les ALP pourraient donc être un des éléments des événements thrombotiques cérébraux. Le blocage de cette augmentation par l'utilisation chez la souris de clopidogrel ou d'inhibiteur de la P-sélectine ouvre une voie thérapeutique intéressante (79).

Marqueurs d'activation/lésion endothéliale : les dosages de la **thrombomoduline soluble** et des facteurs de l'angiogenèse (**VEGF, TSP1**) montrent des taux élevés dans la crise drépanocytaire, reflet de lésion et régénération vasculaire (112,113). Le VEGF altère l'apoptose endothéliale chez les drépanocytaires. Alors qu'à l'état stable, les patients drépanocytaires semblent avoir des taux de progéniteurs endothéliaux comparables aux témoins, il a été montré que la crise drépanocytaire (dans cette étude, il s'agissait d'une atteinte vaso-occlusive aiguë osseuse ou viscérale) s'accompagne d'une augmentation du taux de ces progéniteurs (90).

Cytokines et marqueurs d'inflammation : les patients drépanocytaires présentent une élévation des taux circulants de cytokines pro-inflammatoires et une diminution des taux de cytokines anti-inflammatoires. Des taux bas d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) ont été corrélés à la survenue de CVO et pourraient constituer un facteur prédictif de leur survenue (100).

Microparticules circulantes : au cours de crises vaso-occlusives, il est décrit une augmentation des microparticules totales, qui concernent les différents sous-types (érythrocytaires, leucocytaires, endothéliales et plaquettaires) selon certains auteurs, seulement certains sous-types selon d'autres (48,101,105).

NETs, nucléosomes : Chez des drépanocytaires adultes, les nucléosomes, plus élevés que chez les témoins de même origine ethnique à l'état stable, augmentaient en CVO (83).

5. Données disponibles chez l'enfant

La vasculopathie cérébrale ayant été majoritairement étudiée chez l'enfant drépanocytaire, on dispose de quelques données pédiatriques concernant les

marqueurs précédemment cités pour l'adulte (table 2). Cependant, elles ne concernent que certains marqueurs et ne permettent pas de dessiner un profil complet de la coagulation et de l'activation cellulaire chez ces enfants.

Par ailleurs, même lorsqu'elles sont décrites, le rôle exact de ces anomalies biologiques reste incertain. Sont-elles un reflet de la maladie elle-même ou jouent-elles un rôle dans des phénomènes thrombotiques ? Doit-on les considérer comme un facteur de risque d'événement thrombotique ?

Le degré d'hémolyse a été associé à la vasculopathie cérébrale. Plusieurs marqueurs d'activation de la coagulation qui y sont liés et qui ont été décrits *supra* ont également été associés à la vasculopathie cérébrale (définie par le DTC dans la plupart des études) : il s'agit notamment de l'augmentation des D-dimères, des complexes thrombine-antithrombine, de la génération de thrombine, des fragments 1+2 de la prothrombine, et des taux diminués de protéine C et S. Toutefois, on ne retrouve pas d'analyse multivariée permettant de dégager une association indépendante de l'hémolyse. Si l'hypercoagulabilité est bien démontrée, son lien avec l'atteinte cérébrale microvasculaire est plus net qu'avec l'atteinte des gros vaisseaux. Par exemple, en témoigne l'association retrouvée entre taux bas d'ADAMTS 13 et infarctus cérébraux silencieux (18,116). L'activation de la coagulation peut également représenter un facteur d'aggravation de la vasculopathie car il a été démontré *in vitro* un rôle angiogène de la thrombine, qui est promoteur de la prolifération, la migration et la différenciation des progéniteurs endothéliaux via son récepteur PAR-1 (114). La thrombine est également un promoteur des progéniteurs des cellules musculaires lisses (115).

a. Marqueurs d'hypercoagulabilité

Une hypercoagulabilité a été largement rapportée chez les enfants drépanocytaires (117), médiée par les anomalies érythrocytaires et hémolytiques et leurs conséquences augmentant le potentiel de génération de thrombine (66).

Toutefois, le profil de coagulation est spécifique chez les enfants drépanocytaires. Certains éléments peuvent être interprétés en faveur d'un risque hémorragique. Il s'agit notamment du temps de Quick allongé chez 8% des enfants drépanocytaires homozygotes dans une étude prospective (32% dans une étude rétrospective d'enfants drépanocytaires opérés, tous génotypes confondus), avec diminution des facteurs V et VII, sans allongement du TCK, et avec une variabilité intra-individuelle (anomalies présentes uniquement chez les enfants les plus âgés). Les anomalies biologiques ne

semblaient pas en faveur d'un déficit en vitamine K ni d'insuffisance hépatique dans cette étude (117). Ces éléments en faveur d'un risque hémorragique sont évoqués par les auteurs pour expliquer les saignements péri-opératoires (lors de splénectomie ou cholécystectomie).

Toutefois, on retrouve chez l'enfant drépanocytaire une hypercoagulabilité semblable à celle rapportée chez l'adulte, avec des taux élevés de facteur VIII, de VWF et des fragments 1+2 de la prothrombine (18,118). Une diminution des protéines inhibitrices de la coagulation a également été retrouvée chez 96 enfants drépanocytaires (SS et S β^0) : diminution de la protéine S, de la protéine C et du cofacteur II, et augmentation de la résistance à la protéine C activée dans le groupe non transfusé, comparé aux témoins apparentés (69). Les taux de protéine C et S ont été corrélés négativement à l'intensité de l'hémolyse (66).

	Paramètre	Modification chez l'adulte drépanocytaire / témoin	Modification chez l'enfant drépanocytaire / témoin
Marqueurs d'hémolyse	Taux d'hémoglobine Réticulocytes, bilirubine, LDH, Transaminases	Diminuée Augmentés	Diminuée, corrélée au DTC Augmentés, liés au risque d'infarctus cérébral. Meilleur prédicteur de DTC anormal = réticulocytes
Retentissement anatomique et fonctionnel vasculaire sur la vasodilatation et l'élasticité	Vasodilatation endothélium-dépendante (FMD) Rigidité artérielle, épaisseur intima-media (IMT)	Diminuée Rigidité artérielle augmentée, liée aux AVC. IMT non modifiée	Diminuée Rigidité artérielle et IMT non modifiées
Protéines de la coagulation, état pro-coagulant	Marqueurs standards Facteur VIII, fibrinogène Facteur Willebrand (VWF) Génération de thrombine, D-dimères, TAT, F1+2 prothrombine Facteur tissulaire soluble Inhibiteurs de la coagulation (protéines C et S), système fibrinolytique (complexes plasmine-antiplasmine)	Augmentés Multimères augmentés, corrélation à l'hémolyse Augmentés, corrélation à l'hémolyse. Association D-dimères et ATCD d'AVC Augmenté Inhibiteurs diminués, activation du système fibrinolytique	TQ allongé (>8 ans), FV diminué FVIII augmenté Augmenté, ratio ADAMTS13/VWF diminué et lien avec infarctus silencieux Augmentés et associés au DTC. Association D-dimères et infarctus silencieux Augmenté (et consommation FVII), associé à l'hémolyse Inhibiteurs diminués (association à l'hémolyse et au DTC), activation du

			système fibrinolytique (lien avec HTAP)
Activation des plaquettes et des leucocytes	Taux de plaquettes et de formes jeunes P-sélectine soluble et présentation de P-sélectine sur les plaquettes Taux des leucocytes Amas leuco-plaquettaires (ALP) NETs	Augmentés Augmentées Augmenté, FDR d'hémorragie cérébrale Augmentés Augmentés	Augmentés P-sélectine soluble augmentée Augmenté Augmentés Augmentés chez enfants avec DTC anormal et régulièrement transfusés
Activation / lésion de l'endothélium	Cellules endothéliales circulantes (CEC) Progéniteurs endothéliaux (EPC)	Augmentation modérée, association à l'HTAP Pas modifiés	Pas de données spécifiques Pas de données
Conséquences de l'activation cellulaire : facteurs de croissance et d'adhésion, marqueurs d'activation endothéliale, marqueurs tissulaires d'adaptation à l'ischémie	P-sélectine soluble E-sélectine soluble sVCAM1 sICAM1	Augmentée Augmentée, associée à HTAP sévère Augmenté, lié à HTAP	Augmentée Pas de données Si bas : risque infarctus silencieux diminué, diminue si transfusions régulières Taux bas : risque AVC et infarctus silencieux diminué

	PDGF		Augmenté (lié à HTAP), PDGF-AA élevé FDR d'AVC, lié à l'hémolyse
	PIGF	Augmenté, lié à CVO fréquentes	
	Cytokines pro-inflammatoires	Augmentées	
	Cytokines anti-inflammatoires	Diminuées	IL1- β protectrice pour infarctus cérébral
Conséquences de l'activation cellulaire : les microparticules circulantes	Microparticules circulantes	Augmentées, corrélées à l'état procoagulant et à l'hémolyse	Augmentées, corrélées à l'état procoagulant et à l'hémolyse

Table 2 : Modifications biologiques chez l'adulte et l'enfant drépanocytaire à l'état stable, lien avec la vasculopathie cérébrale

F1+2 prothrombine : fragments 1+2 de la prothrombine, FDR : facteur de risque, HTAP : hypertension artérielle pulmonaire, TAT : complexes thrombine-antithrombine.

Les références sont disponibles dans le corps du texte.

b. Hypercoagulabilité et atteinte vasculaire

Des taux abaissés de protéine C et S ont été retrouvés chez des patients ayant eu un infarctus cérébral par rapport à ceux n'ayant pas eu d'événement neurovasculaire (101). Si les taux d'antithrombine étaient comparables aux non drépanocytaires, les complexes thrombine-antithrombine et les fragments F1+2 de la prothrombine étaient élevés chez ces enfants drépanocytaires et les transfusions régulières ne les normalisaient pas. Ces modifications ne semblaient pas corrélées à la présence d'une vasculopathie cérébrale (définie par le DTC) (69). Des taux de t-PA diminués (témoins d'une hypofibrinolyse) ont été retrouvés chez les enfants drépanocytaires ; ils ne corrôlaient pas avec l'atteinte vasculaire cérébrale mais avec l'atteinte vasculaire pulmonaire (hypertension artérielle pulmonaire) (18).

La résultante d'une hypercoagulabilité est une augmentation de la génération de thrombine. Chez 97 enfants drépanocytaires (SS, SC, S β +), environ 40% présentaient une génération de thrombine supérieure à celle des contrôles (>+2DS). Le potentiel de génération de thrombine diminuait avec l'âge et corrôlait avec l'hémolyse (66). Certains paramètres de génération de thrombine semblent corrôlés à la vasculopathie cérébrale : des vitesses élevées au TCD corrôlaient avec des taux plus élevés de complexes thrombine-antithrombine (109). En tenant compte de l'effet de l'âge (vitesses au DTC plus élevées chez les plus jeunes), les auteurs concluent à une probable association entre génération de thrombine et vasculopathie cérébrale (66). Des taux élevés de D-dimères (produits de dégradation de la fibrine) corrôlaient avec une vitesse élevée au DTC dans une étude, avec la présence d'infarctus cérébraux silencieux dans une autre (sans confirmation en analyse multivariée) (18,109).

Chez l'enfant drépanocytaire, des taux élevés de monocytes présentant le TF ont été retrouvés (témoins = enfants de même race), corrôlés à des taux élevés de sTF, de complexes thrombine-antithrombine et de D-dimères. Ces différents éléments corrôlaient tous avec des marqueurs d'hémolyse (en analyse multivariée) (119).

Des taux élevés de F1+2 de la prothrombine ont été mis en évidence chez des enfants avec TCD pathologique, dont la normalisation sous programme transfusionnel n'est pas systématique (62).

Tout comme chez l'adulte, les hauts multimères de VWF, exprimés par une diminution du rapport de l'activité de la protéase ADAMS13 sur l'antigène VWF, sont plus élevés chez les enfants drépanocytaires SS et S β ^o que chez les témoins de même ethnie et

que chez les enfants drépanocytaires SC. Parmi ces patients, les enfants avec infarctus cérébral silencieux présentaient des ratios activité ADAMTS 13 / antigène VWF encore inférieurs à ceux sans infarctus silencieux. Une hypoactivité ADAMTS 13 pourrait de ce fait être insuffisante pour contrer l'augmentation de VWF en situation d'activation endothéliale et conduire à des micro-infarctus cérébraux (18).

c. Activation plaquettaire, endothéliale, leucocytaire, et conséquences cliniques

Comme chez l'adulte, des taux d'amas leuco-plaquettaires (ALP) étaient significativement plus élevés ($p < 0.01$) chez des adolescents drépanocytaires que chez des contrôles (120). En revanche, dans une première étude pédiatrique incluant 24 enfants drépanocytaires, le taux d'ALP était comparable à celui des contrôles (mais 10/24 étaient en programme transfusionnel, ce qui a pu modifier les résultats) (121,122). Une augmentation de la sP-sélectine a été rapportée chez des enfants drépanocytaires, comparés à des témoins (18,121,123).

Un taux élevé de MP a été corrélé à l'état procoagulant du patient et à l'hémolyse, y compris chez l'enfant (48,66,105).

Concernant les NETs, il a été retrouvé un niveau de MPO (enzyme des neutrophiles) plus élevé chez les enfants drépanocytaires avec vasculopathie cérébrale et régulièrement transfusés (124).

Il n'existe pas de données sur les taux de CEC et d'EPC chez l'enfant drépanocytaire. Dans d'autres situations, une élévation des CEC dans les infarctus cérébraux de l'enfant liés à une artériopathie cérébrale aiguë transitoire (TCA Transient Cerebral Arteriopathy) a été montrée (125).

Concernant les marqueurs d'activation et d'adhésion de l'endothélium, les transfusions régulières permettaient de diminuer les taux de sVCAM1 chez l'enfant drépanocytaire (124). Des taux bas à l'état stable (hors transfusion) de sICAM-1 étaient associés à une probabilité plus élevée de rester sans infarctus cérébral chez des enfants de l'étude STOP à haut risque (TCD anormal) (124). Il n'existe pas de donnée sur la sE-sélectine.

d. Facteurs de croissance et autres marqueurs d'inflammation

Un rôle des facteurs d'adhésion et angiogènes dans la genèse des AVC des enfants drépanocytaires a été proposé devant des résultats d'études ancillaires de l'étude STOP.

Des taux élevés à l'état stable (hors transfusion) de BDNF (Brain Derived Neurotropic Factor, biomarqueur de survie neuronale et ischémie cérébrale), sVCAM1, PDGF-AA (Platelet Derived Growth Factor, facteur angiogénique qui serait un biomarqueur du remodelage vasculaire), t-PAI-1 et sICAM-1 étaient associés à une probabilité plus élevée d'infarctus cérébral chez des enfants avec TCD anormal (124). Les taux de PDGF-AA diminuaient chez les patients transfusés, ainsi que le risque d'infarctus cérébral. La corrélation de certains de ces marqueurs à la sévérité de l'anémie fait discuter l'indépendance de ces résultats (126).

Les résultats de la plupart des dosages de cytokines (IL-1b, IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN-c) ne montrent pas d'association avec un DTC anormal. Seule l'IL-1beta était associée à une protection vis-à-vis de la survenue d'infarctus cérébral, rôle retrouvé par ailleurs dans l'accident vasculaire cérébral, à la fois neuroprotectrice et favorisant l'inflammation (126,127).

B. Travail personnel

Plusieurs aspects de l'atteinte des vaisseaux cérébraux et des lésions cérébrales d'origine neurovasculaire ont été abordés, selon des orientations différentes, donnant lieu à 3 travaux originaux. Dans ces travaux, les patients étudiés étaient des enfants suivis au centre de référence des syndromes drépanocytaires majeurs de l'hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades à Paris. Ces travaux se voulaient transversaux et multidisciplinaires, à la croisée de la clinique, la biologie, la mécanique artérielle et cherchaient à faire des liens entre pathologie des petites et des grosses artères, signes cliniques simples et phénomènes microthrombotiques complexes, pathologie artérielle sténosante ou ectasique, pathologie de l'enfant et de l'adulte.

Le premier travail portait sur la recherche de marqueurs biologiques ou mécaniques liés au Doppler Transcrânien. De nombreux marqueurs ont été publiés (cf partie A. Bibliographie) mais il semblait intéressant d'inclure de nouveaux paramètres biologiques, reflétant notamment l'activation cellulaire et de la coagulation, ainsi que des paramètres de mécanique artérielle. L'objectif était également d'étudier la valeur prédictive de ces paramètres sur la survenue d'événements vasculaires et sur l'évolution du Doppler dans une cohorte d'enfants drépanocytaires suivis prospectivement (étude DYVA).

Le second travail, prolongeant l'étude des conséquences de l'activation de la coagulation, a porté sur les céphalées et migraines chez l'enfant drépanocytaire, dans la même cohorte DYVA. Selon l'hypothèse récente de la possibilité que la migraine reflète des événements ischémiques cérébraux ultra-transitoires, nous avons étudié le profil de coagulation des enfants drépanocytaires migraineux par rapport aux autres, dans une pathologie où l'hypercoagulabilité est présente dès l'état basal, afin d'analyser si cette hypothèse se vérifie et si les céphalées peuvent/doivent être considérées comme un signe d'atteinte (micro)vasculaire cérébrale chez ces enfants.

Enfin, dans le troisième travail, nous nous sommes intéressés au lien entre risque ischémique cérébral et risque hémorragique cérébral. Nous avons réalisé une étude rétrospective des patients suivis dans le centre de référence. L'objectif était de vérifier si les stratégies de prévention de l'infarctus cérébral avaient un impact sur l'incidence des événements hémorragiques cérébraux et d'approfondir l'étude du lien envisagé entre vasculopathie sténosante et ectasique. Ce travail nous a également permis de décrire les anévrysmes intra-crâniens de l'enfant drépanocytaire.

Pour chacun de ces travaux présentés dans les pages suivantes, l'objectif de la recherche et les méthodes employées sont tout d'abord rappelés. L'article scientifique correspondant est inclus à la suite, précédé d'un bref résumé des résultats principaux qui y sont exposés. Une discussion et mise en perspective des résultats permet de préciser ce que ce travail apporte par rapport à la littérature et aux connaissances dans le domaine.

I. Recherche de marqueurs biologiques ou mécaniques liés au Doppler Transcrânien et étude de leur valeur prédictive sur la survenue d'événements vasculaires dans une population d'enfants drépanocytaires : étude DYVA

1. Objectifs

Le doppler transcrânien est la méthode de référence pour le dépistage et le suivi de la vasculopathie cérébrale chez l'enfant drépanocytaire. Il permet également de stratifier les patients en fonction de leur risque d'infarctus cérébral. Cependant, comme détaillé dans la partie bibliographie, les déterminants de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire sont multiples. Les données de la littérature concernant l'association de marqueurs au doppler transcrânien sont abondantes. Les marqueurs qui semblent avoir l'association la plus forte et la plus reproductible avec le DTC chez l'enfant sont les marqueurs d'hémolyse, notamment les réticulocytes. Des éléments cliniques, comme l'âge jeune, la présence d'une hypertension artérielle pulmonaire, sont également associés à un DTC anormal.

Même si la procédure d'examen dans le cadre de la drépanocytose est précisément décrite, le DTC reste un examen opérateur-dépendant. Il est donc intéressant de rechercher d'autres marqueurs de la vasculopathie cérébrale. Trouver des marqueurs objectifs et reproductibles (par exemple marqueurs biologiques) est particulièrement pertinent dans les pays où le DTC n'est pas disponible, par exemple dans certains pays d'Afrique. Même dans les pays développés, où l'accès au Doppler est facile et où cet examen non invasif et non irradiant est un excellent outil de diagnostic et de suivi, il est intéressant de mettre en évidence des marqueurs associés à la vasculopathie cérébrale, car ils permettent d'éclairer les connaissances physiopathologiques de cette atteinte plurifactorielle. Par ailleurs, si le DTC est un bon outil prédictif des complications neurovasculaires (ou tout au moins des infarctus cérébraux symptomatiques), il existe peu de marqueurs prédictifs francs des autres complications de la drépanocytose, comme les complications microvasculaires périphériques : syndrome thoracique aigu, séquestration splénique aiguë, priapisme, etc...

Ainsi, il semblait intéressant de pouvoir étudier un panel de biomarqueurs choisis selon leur pertinence supposée à partir des données récentes de la littérature, particulièrement abondante, concernant la vasculopathie cérébrale drépanocytaire, et d'analyser leur éventuelle association au Doppler transcrânien et leur prédictivité pour les événements

vasculaires neurologiques et périphériques. Nous avons fait le choix pour cette étude, non pas d'être exhaustif, mais de cibler à la fois des paramètres « classiques » servant de validation du modèle et des paramètres plus récemment évoqués dans la drépanocytose et peu ou pas étudiés chez l'enfant, ainsi que d'autres paramètres impliqués dans d'autres maladies vasculaires mais qui n'avaient pas été étudiés dans la drépanocytose. Il s'agissait ainsi de paramètres d'activation endothéliale et leucocytaire, dont les nucléosomes représentant la NETose, de la mobilisation des cellules souches et de marqueurs d'activation plaquettaires et de la coagulation. Comme il s'agissait d'une étude pédiatrique, l'objectif de limiter le volume de prélèvement sanguin était un argument supplémentaire pour sélectionner soigneusement la pertinence des paramètres à étudier, tout en balayant des marqueurs représentant différents mécanismes impliqués, afin de garder le maximum d'informativité.

Nous avons souhaité réaliser une étude multidisciplinaire transversale, permettant le recueil de données cliniques, d'anamnèse, de paramètres de mécanique vasculaire, d'éléments biologiques afin d'avoir une vision la plus globale possible de la maladie et de ses mécanismes. Le recrutement des patients s'est appuyé sur la cohorte des 600 enfants atteints de syndrome drépanocytaire majeur suivie dans le centre de référence des syndromes drépanocytaires majeurs de l'hôpital Necker-Enfants Malades à Paris (Pr M de Montalembert, Dr V Brousse) et bénéficiant d'un suivi régulier. Les points forts de cette équipe étaient notamment son expertise concernant la drépanocytose pédiatrique et l'expérience de travaux de recherche clinique ayant permis la publication de résultats reconnus, garantissant un travail de qualité. Le site de Necker-Enfants Malades rassemble plusieurs spécialités pédiatriques ayant un intérêt ou une compétence dans le domaine vasculaire, qu'il s'agisse d'atteinte neurovasculaire ou d'autres organes (cardiopédiatrie...) et les pathologies vasculaires de l'enfant représentent une thématique transversale du site. Les compétences de ces différentes équipes, associées à l'expertise et aux compétences de l'unité Inserm U1140 du Pr P Gaussem, donnaient l'opportunité d'un travail transversal et multidisciplinaire, permettant la mise en commun de plateaux techniques, d'expérience et des idées sur les thématiques abordées dans ce travail.

2. Méthode

L'étude DYVA (DrépanocYtose Vasculopathie cérébrAle) était une étude en 2 temps : une première phase était une étude transversale analysant l'association de différents paramètres au doppler transcrânien, la seconde phase était un suivi prospectif de la cohorte avec le recueil

de l'évolution du DTC et la survenue d'événements cliniques vasculaires afin d'étudier la prédictivité des marqueurs mis en évidence lors de la première phase (figure 7).

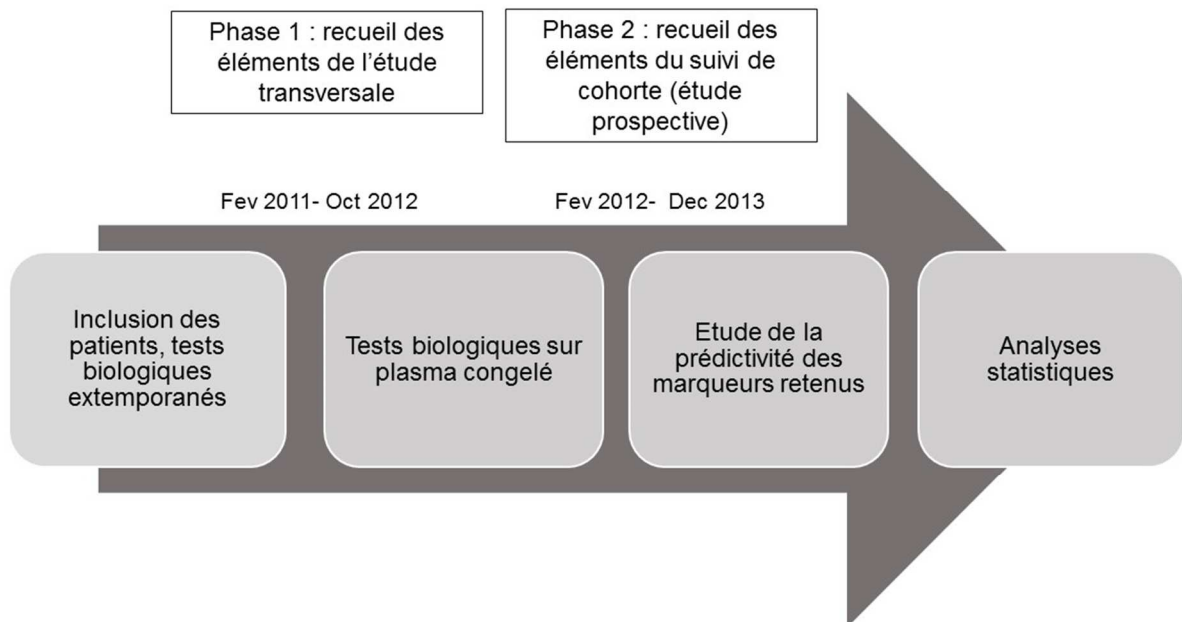


Figure 7 : Déroulement de l'étude DYVA avec ses 2 phases

a. Populations incluses

Plusieurs populations ont été incluses dans cette étude, qui prévoyait initialement l'inclusion prospective de 150 patients âgés de 2 à 16 ans sur 18 mois.

Patients drépanocytaires à l'état stable :

Il s'agissait du groupe de patients chez qui nous souhaitons évaluer les différents paramètres recueillis et leur association éventuelle au DTC.

Critères d'inclusion :

- enfant porteur d'un syndrome drépanocytaire majeur (SS ou S β ⁰)
- âgé d'au moins 3 ans et d'au maximum 18 ans (l'âge minimum a été choisi pour que les patients puissent être en capacité d'avoir l'échographie vasculaire périphérique, l'âge maximum était celui du transfert en équipe de drépanocytose adulte et donc de fin du suivi pédiatrique)
- suivi au centre de référence de Necker-Enfants Malades
- à l'état stable, défini par l'absence d'hospitalisation pour crise vaso-occlusive, syndrome thoracique aigu, séquestration splénique aiguë, et l'absence de transfusion dans les 2 mois précédant l'inclusion.
- consentement des parents recueilli, assentiment de l'enfant

Critères d'exclusion :

- patient sous programme transfusionnel (ce traitement modifie le DTC)
- patient non affilié à la Sécurité Sociale

Les patients sous hydroxyurée ont été inclus et l'analyse statistique stratifiée selon l'utilisation de ce traitement ou non.

Patients drépanocytaires en crise vaso-occlusive :

Il nous a semblé intéressant, afin de valider quelques un des premiers résultats de nos analyses, d'inclure des patients qui correspondaient aux critères d'inclusion pour l'état stable, mais au moment d'une hospitalisation pour crise vaso-occlusive. L'idée était de comparer certains paramètres à l'état stable et en crise. Il était possible d'inclure des patients déjà inclus à l'état stable ou des patients non inclus à l'état stable.

Critères d'inclusion :

- enfant porteur d'un syndrome drépanocytaire majeur (SS ou S β ⁰)
- âgé d'au moins 3 ans et d'au maximum 18 ans
- suivi au centre de référence de Necker-Enfants Malades
- Prélèvement ayant lieu lors d'une hospitalisation pour CVO ou STA, moins de 72h après le début des symptômes.
- consentement des parents recueilli, assentiment de l'enfant

Critères d'exclusion :

- patient sous programme transfusionnel ou transfusion dans les 2 mois précédant le prélèvement
- patient non affilié à la Sécurité Sociale

Population témoin :

L'étude de l'association au DTC de paramètres recueillis de manière transversale dans une population ne nécessitait pas sur le plan statistique de population témoin. Cependant, comme nous avons étudié des marqueurs qui ne l'avaient pas encore été chez les enfants drépanocytaires, pour lesquels il n'existait bien souvent pas de norme pédiatrique ou pas de norme en fonction de l'origine ethnique, il nous a semblé judicieux d'inclure également une petite population d'enfants contrôles d'origine africaine ou des Caraïbes. Ceci nous a permis par la suite de pouvoir interpréter les valeurs obtenues chez les patients à l'état stable et en crise.

Critères d'inclusion :

- Enfant de 3 à 18 ans
- d'origine ethnique africaine ou des Caraïbes (par les 2 parents)
- ayant eu à la naissance un dépistage néonatal de la drépanocytose, sans résultat positif annoncé.
- Patient venant en consultation ou hospitalisation programmée à Necker-Enfants Malades avec un prélèvement sanguin prévu
- ne présentant ni maladie aiguë, ni maladie chronique cardiaque, vasculaire ou inflammatoire
- consentement des parents recueilli, assentiment de l'enfant

Le statut biologique de témoin vis-à-vis de la drépanocytose a été vérifié par le dosage de l'hémoglobine F, qui devait être <1% pour être retenu, excluant ainsi les syndromes drépanocytaires majeurs et les hétérozygotes.

Critères d'exclusion :

- transfusion ou épisode aigu <2 mois
- patient non affilié à la Sécurité Sociale

b. Etude du DTC (patients à l'état stable)

Pour chacun des patients inclus à l'état stable, les données du DTC le plus proche de l'inclusion (si possible <6 mois) étaient recueillies, notamment la catégorie selon le protocole STOP et les recommandations internationales (normal, conditionnel, incomplet, pathologique) (128). Il s'agissait de leur DTC de routine, pratiqué annuellement à partir de l'âge de 2 ans dans le service d'imagerie pédiatrique (Pr Boddaert) de l'hôpital Necker-Enfants Malades. Nous avons regroupé les dopplers normaux et incomplets (c'est à dire les dopplers pour lesquels certaines mesures n'avaient pas été possibles du fait du manque de perméabilité de la fenêtre osseuse mais dont toutes les valeurs recueillies étaient normales) dans un groupe « doppler normal » et les dopplers conditionnels et pathologiques dans un groupe « doppler anormal », en considérant qu'un doppler conditionnel était déjà une situation à risque d'infarctus cérébral augmenté (10).

Selon la littérature et notre expérience, environ 10% des patients d'une cohorte ont un DTC pathologique à un temps t (10). Il était donc prévisible que le groupe de patients avec DTC anormal serait d'effectif faible, limitant les possibilités d'analyse statistique. Considérant également que les limites de normalité du DTC ont été établies de manière pragmatique pour obtenir un seuil de risque significatif mais que la vasculopathie cérébrale est une maladie chronique, d'installation progressive, nous avons souhaité réaliser une analyse du DTC en utilisant la vitesse (TAMMV) maximale mesurée lors de l'examen. Ceci permettait de considérer cette donnée du DTC comme une variable continue, suggérant une meilleure puissance statistique et une variable reflétant probablement mieux la réalité physiopathologique. Cette approche était originale puisque toutes les études de la littérature utilisent classiquement les seuils et les catégories établis par les études STOP.

c. Paramètres cliniques, antécédents, statut cardiologique

La grille de recueil des données cliniques a été élaborée et validée en collaboration avec le Pr I Desguerres (service de Neuropédiatrie de Necker-Enfants Malades). Y étaient en particulier reportés :

- **Les antécédents familiaux neurovasculaires** (infarctus cérébral symptomatique / silencieux, hémorragie cérébrale, thrombose veineuse cérébrale, accident ischémique transitoire), **cardiovasculaires** (hypertension artérielle, infarctus du myocarde,

syndrome coronarien, cardiopathie ischémique) et **thromboemboliques** (thrombose veineuse profonde, embolie pulmonaire)

- **Les antécédents personnels vasculaires** (idem antécédents familiaux) et de **complications de la drépanocytose** (nombre de crises vaso-occlusives, de syndromes thoraciques aigus, de séquestration splénique aiguë, épisodes de priapisme pour les garçons)
- **La scolarité** : niveau scolaire par rapport à la classe attendue, difficultés rapportées
- **Les céphalées** : céphalées récurrentes et critères IHS de migraine (ces paramètres sont détaillés dans la partie II)
- **L'examen clinique neurologique** : recherche de syndrome pyramidal, extra-pyramidal, cérébelleux, atteinte des paires crâniennes, motricité fine
- **Le score de Rankin modifié (mRS)** : score international normalisé codant l'état neurologique «fonctionnel» du patient, c'est à dire le retentissement d'une éventuelle atteinte neurologique
- **La mesure de la pression artérielle** et de la **saturation artérielle** en oxygène transcutanée au repos
- **Les mensurations** : poids, taille, périmètre crânien, exprimés en déviation standard par rapport aux normes pédiatriques pour l'âge
- Un éventuel traitement en cours par **hydroxycarbamide** et son indication.

La validité des données obtenues a été vérifiée. La fiche de recueil de données cliniques est fournie en annexe.

Concernant le statut cardiologique, nous avons recueilli les résultats de la dernière échocardiographie réalisée chez les patients inclus dans l'étude DYVA. Du fait d'une association montrée entre HTAP et vasculopathie cérébrale, nous souhaitons obtenir une **estimation de la pression artérielle pulmonaire** pour les patients inclus. Celle-ci était calculée par la mesure doppler de la vélocité de l'insuffisance tricuspide permettant le calcul approché du gradient de pression entre ventricule droit et oreillette droite, soit une estimation de la pression artérielle pulmonaire. L'échocardiographie morphologique et fonctionnelle et l'étude doppler étaient réalisées par l'équipe de cardiologie pédiatrique sur le site de Necker-Enfants Malades (Pr Bonnet). Cette échographie est incluse dans les bilans annuels en hôpital de jour pour les patients de plus de 8 ans. Ce paramètre n'a pu être recueilli que pour la moitié des patients inclus environ de ce fait.

d. Paramètres biologiques

Lors d'un bilan prévu pour ces patients, en consultation ou en hôpital de jour annuel, étaient ajoutés des paramètres biologiques détaillés dans le tableau ci-dessous, connus ou suspectés d'une relation avec la vasculopathie cérébrale drépanocytaire. Le choix de ces paramètres a été fait en fonction de l'analyse de la littérature présentée dans la partie A (cf table 2).

Ces examens étaient pratiqués en routine par le laboratoire d'hémostase de l'hôpital Necker-Enfants Malades (Dr Lasne) et par l'équipe du Pr Gaussem à l'unité U1140 et dans le laboratoire d'hématologie de l'hôpital européen Georges Pompidou (Pr AM Fischer, Pr Gaussem). Le dosage des microparticules a été réalisé à Marseille dans l'équipe du Pr Dignat-George (UMR-S1076). La chromatographie des acides aminés plasmatiques a été réalisée dans le laboratoire de biochimie B à Necker-Enfants Malades par le Dr Ottolenghi (Sce du Pr Vekemans).

Une partie des examens biologiques a été réalisée extemporanément, l'autre sur prélèvement congelé (dont une partie après ultracentrifugation pour analyse des microparticules) pour réalisation différée et regroupée des dosages.

Les paramètres biologiques ainsi recueillis sont présentés dans le tableau 3.

Hémolyse	Réticulocytes Bilirubine, LDH, Transaminases Microparticules dérivées des érythrocytes (Ery-MP)
Protéines de la coagulation, état pro-coagulant	Marqueurs standards (TQ, TCA) Facteur VIII, fibrinogène Facteur Willebrand (VWF) Paramètres de vitesse et force du caillot mesurés par le TEG® Génération de thrombine mesurée par le TEG® D-dimères Inhibiteurs de la coagulation (protéines C et S, antithrombine)
Atteinte vasculaire périphérique	Rapport arginine/ornithine (reflet de la biodisponibilité du NO) par chromatographie des acides aminés plasmatiques (CAA) Créatinine plasmatique, rapport urinaire microalbumine/créatinine (néphropathie vasculaire)
Activation des plaquettes et des leucocytes	Taux de plaquettes et volume plaquettaire moyen (évaluant le taux de formes jeunes) P-sélectine soluble Taux des leucocytes Amas leuco-plaquettaires (ALP) Nucléosomes (reflet de la NETose) Thrombospondine 1
Activation / lésion de l'endothélium	Cellules endothéliales circulantes (CEC) Cellules souches CD34+, CD34-133+ VEGF Microparticules dérivées des cellules endothéliales (Endo-MP) Thrombomoduline soluble
Conséquences de l'activation cellulaire	P-sélectine soluble E-sélectine soluble
Microparticules circulantes	Microparticules circulantes d'origine érythrocytaire, leucocytaire, endothéliale et plaquettaire
Inflammation	CRP Leucocytes VWF

Table 3 : Paramètres biologiques recueillis dans l'étude DYVA

Les méthodes d'analyse de ces différents paramètres sont détaillées dans le manuscrit de l'article inclus ci-après.

En complément, nous présentons ici les arguments du choix du thromboélastogramme et des paramètres qu'il fournit pour l'évaluation de la formation du caillot et de la génération de thrombine, des précisions sur la technique de mesure des microparticules et sur le choix des nucléosomes pour évaluer la NETose.

Thromboélastogramme (TEG®)

Nous souhaitons mesurer l'adhésion plaquettaire en sang total et obtenir des paramètres décrivant l'hypercoagulabilité des patients drépanocytaires. Or, pour cette étude pédiatrique, nous n'avons pas pu utiliser des méthodes d'analyse en chambre sur sang total, qui demandaient un volume de prélèvement trop important. Nous avons donc choisi de réaliser un thromboélastogramme (TEG® Haemonetics), qui ne nécessite que 2x500µL de sang (analyse en double) et est donc adapté aux prélèvements en pédiatrie. Le thromboélastogramme est une technique d'analyse rapide se fait sur sang total, en utilisant l'activation de la phase contact par le kaolin. Il se fait sur sang frais, dans les 30 minutes qui suivent le prélèvement (figure 8). Nous avons donc dû organiser les prélèvements et leur acheminement afin de garantir ces conditions d'analyse optimale. Le TEG® donne des informations sur la rapidité du caillot à se former, sa vitesse de croissance, sa force et sa vitesse de dégradation.

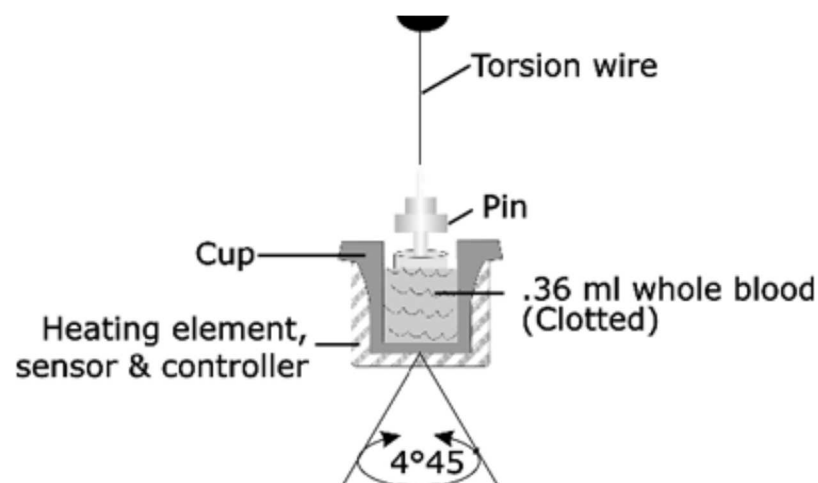


Figure 8 : Principe de fonctionnement du thromboélastogramme
D'après notice Haemonetics.

Les paramètres ainsi obtenus sont :

- i. le temps écoulé avant que la fibrine ne commence à se former, dépendant des facteurs de la coagulation (« portion enzymatique de la coagulation ») : paramètre mesuré par l'intervalle R (en secondes),
- ii. la vitesse de formation du caillot (temps nécessaire pour obtenir un certain niveau de force du caillot, c'est à dire une amplitude de 20mm) reflétée par le paramètre K (en minutes),
- iii. La vitesse à laquelle la fibrine s'organise et les liens (cross-linking) se forment (rate of clot formation), qui est lié au fibrinogène : c'est l'angle α (en degrés)
- iv. la force maximale du caillot donnée par le MA (amplitude maximale de force de torsion du fil, en mm) qui reflète la capacité dynamique de fixation des plaquettes et de la fibrine via le GPIIb/IIIa. Ce paramètre est dépendant de l'activité du fibrinogène (contribution pour environ 20-30%) et des plaquettes (contribution pour environ 70-80%),
- v. l'élasticité (shear elastic modulus strength, SEMS) du caillot est reflétée par le paramètre G, dépendant du MA et des plaquettes,
- vi. la lyse du caillot est reflétée par les paramètres LY 30 et 60 (décroissance de l'amplitude en % à 30 et 60 minutes après obtention du maximum MA),
- vii. Les dérivées premières des précédents paramètres, notamment l'aire sous la courbe de vélocité, reflètent la génération de thrombine et sont exprimées avec plusieurs paramètres (figure 9) : TTG Total Thrombus generation (aire totale sous la courbe, 100*mm), très corrélé à la génération de thrombine mesurée dans des dispositifs TAT (Thrombin-anti-thrombin), MRTG maximum rate of thrombus generation (100*mm/s), TMRTG (time to maximum rate of thrombus generation), TMRTL (time to maximum rate of lysis) et L (total lysis).

On considère qu'il y a hypercoagulabilité si 2 ou plus des modifications suivantes sont observées : raccourcissement du R, du K, augmentation du α et/ou du MA.

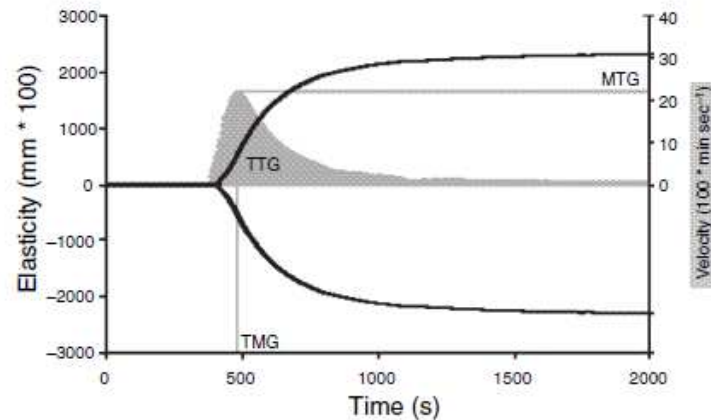


Fig. 1. A representative thrombelastograph® (TEG®) tracing obtained during the clotting process of the whole blood of a normal subject. The shaded area of the tracing represents the velocity curve and the shaded vertical axis represents the velocity axis. The parameters are: MTG, maximum rate of thrombus generation ($100 \cdot \text{mm s}^{-1}$); TEG, total area under the curve, measures total thrombus generation ($100 \cdot \text{mm}$); TMG, time to maximum rate of thrombus generation(s).

Figure 9 : Paramètres de génération de thrombine obtenus à partir du TEG®
Tiré de Rivard, J Thromb Haemost 2005 (129)

Microparticules

Le dosage des microparticules a été réalisé sur prélèvement de sang sur tube citraté, ultracentrifugé dans l'heure suivant le prélèvement puis congelé. La quantification des microparticules de diverses origines (plaquettaires, érythrocytaires et monocytaires) à partir des prélèvements congelés a été réalisée en cytométrie en flux, comme rapporté dans la littérature (101). Le dosage des microparticules circulantes étant influencé par le temps écoulé entre la ponction veineuse et la centrifugation, les prélèvements ont été immédiatement transportés au laboratoire après la ponction veineuse et centrifugés rapidement (dans l'heure suivant la ponction) puis congelés à -80°C . Une double centrifugation a été réalisée selon les recommandations de la littérature (elle permet d'éliminer davantage de cellules plaquettaires, leucocytes, cellules endothéliales). La préparation des échantillons a été réalisée au laboratoire d'hématologie de Necker-Enfants Malades, nous en avons assuré le transport et le dosage des microparticules a été réalisé à l'unité Inserm UMR-S1076 du Pr F Dignat-George, à Marseille.

La méthode de dosage des microparticules était celle décrite par l'équipe dans l'article de Robert et al. (130). Les échantillons ont tous été analysés dans un intervalle de temps inférieur

2 ans après congélation, car il a été montré que la durée de congélation modifie les taux de MP (101,102).

Nucléosomes & NETose

Les nucléosomes circulants étant de bons marqueurs de la formation de NETs (83), nous avons réalisé le dosage de nucléosomes chez les patients de l'étude DYVA pour estimer la NETose chez ces patients. La technique est peu décrite chez l'humain puisque la littérature concerne essentiellement des dosages chez l'animal. Nous avons trouvé une seule étude dosant les nucléosomes chez des patients avec microangiopathie thrombotique (81). Nous avons donc pris contact avec les auteurs afin d'échanger sur l'adaptation de kits ELISA, dont l'utilisation est validée chez l'animal ou chez l'humain uniquement pour des surnageants de culture cellulaire. Nous avons ensuite repris la technique et le kit utilisés dans cette publication de Fuchs et al, selon les avis des auteurs. Nous avons donc dosé les nucléosomes par technique ELISA, au moyen du kit Cell death detection kit, Roche® et pris comme unité de référence la moyenne des taux retrouvés dans notre population témoin, selon les recommandations du fournisseur et la publication référencée ci-dessus.

Banque d'ARN pour étude protéomique

Une banque d'ARN totaux a également été constituée à partir d'un prélèvement de 3mL de sang total sur tube *Tempus blood RNA*, congelé et stocké à -80°C. L'utilisation de cette banque d'ARN totaux est prévue ultérieurement, après extraction, dans le laboratoire du Pr Gaussem (UMR-S1140).

e. Paramètres de mécanique vasculaire

Ces examens étaient pratiqués en routine dans le service de cardiopédiatrie de l'hôpital Necker-Enfants Malades (Pr Bonnet), par Mme I Szezepanski, le jour de l'inclusion du patient.

Vasodilatation endothélium-dépendante, mesure de la FMD: Cette technique était réalisée par l'équipe de cardiopédiatrie de Necker-Enfants Malades (Pr D. Bonnet, Dr M. Lévy, I. Szezepanski) qui l'avait déjà utilisée pour un autre protocole de recherche chez l'enfant drépanocytaire (52). La mesure échographique des modifications de calibre de l'artère brachiale en réponse à une hyperhémie réactionnelle a été décrite précédemment (52). Afin de distinguer vasodilatation endothélium-dépendante et non-endothélium-dépendante, une épreuve de vasodilatation à la trinitrine était également effectuée (cf description dans la partie

Bibliographie). Une exploration artérielle plus complète avec mesure des paramètres suivants au niveau de l'artère carotide commune a été réalisée : mesure de l'épaisseur intima-média (IMT), des diamètres systolique et diastolique de la carotide permettant l'estimation de la distensibilité, de la compliance, du module élastique incrémentiel (Einc). Ces examens étaient réalisables à partir de l'âge de 4-5 ans, en fonction du degré de coopération de l'enfant. Ils n'ont pu être réalisés que pour la moitié de l'échantillon, du fait d'une part de l'âge jeune de certains patients, d'autre part de contraintes d'horaires des familles et des professionnels, rendant parfois difficile l'organisation de cette exploration.

f. Suivi prospectif et survenue d'événements vasculaires

Les patients inclus dans DYVA faisaient partie de la cohorte d'enfants drépanocytaires suivis au centre de référence de l'hôpital Necker-Enfants Malades. Ils ont donc bénéficié d'un suivi prospectif standardisé. Les données d'évolution cliniques et de DTC ont été recueillies jusqu'à la clôture de l'étude.

L'évolution du DTC a été notée : date et résultats (catégorie, vitesse maximale) du DTC pratiqué au moins 6 mois après l'inclusion. La survenue d'événements cliniques vasculaires périphériques ou cérébraux a été également recueillie, ainsi que le délai de survenue de la première complication de chaque type.

Evénements neurovasculaires considérés comme significatifs s'ils survenaient pendant la phase de suivi :

- infarctus cérébral,
- accident ischémique transitoire,
- hémorragie cérébrale,
- thrombose veineuse cérébrale,
- passage de la catégorie normale à anormale pour le DTC,
- diagnostic d'anévrisme intracrânien
- début d'un traitement par hydroxycarbamide ou d'un programme transfusionnel pour des raisons neurovasculaires

Evénements vasculaires périphériques considérés comme significatifs :

- syndrome thoracique aigu (STA)
- priapisme
- séquestration splénique aiguë (SSA)
- ostéonécrose de la tête fémorale
- apparition d'une protéinurie (néphropathie vasculaire)
- thrombose veineuse profonde
- début d'un traitement par hydroxycarbamide pour CVO fréquentes ou STA/SSA répétés

Les CVO osseuses ou abdominales n'entraînant pas de modification du traitement de fond n'ont pas été considérées comme des événements vasculaires périphériques significatifs pour cette étude.

g. Considérations éthiques

Cette étude a reçu l'approbation du Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile de France II sous le numéro 2011-01-04. L'investigateur principal était le Dr Manoëlle Kossorotoff.

Pour les patients (à l'état stable et lors de crises vaso-occlusives), le volume total des prélèvements sanguins étant considéré comme du soin courant (<20mL supplémentaires par patient) et aucun examen invasif n'étant réalisé en plus du bilan habituel des patients, aucune autorisation supplémentaire n'a été nécessaire. Par rapport au bilan habituel du patient, seuls 12mL supplémentaires étaient prélevés.

Tous les patients et leurs parents ont reçu une information orale et écrite. Tous les parents, ainsi que les enfants âgés de plus de 12 ans ont donné leur consentement par écrit, les enfants de moins de 12 ans ont donné leur assentiment oral.

Population témoin : une autorisation du CPP n'a pas été nécessaire, selon la réglementation AFSSAPS de septembre 2009, relative aux études liées aux DMDIV et nécessitant la collecte d'échantillons d'origine humaine. En effet, la quantité de sang utilisée pour l'étude lors du prélèvement déjà prévu chez ces patients était d'un volume s'apparentant à l'utilisation des « fonds de tubes ». Le consentement écrit des parents et des enfants de plus de 12 ans, ainsi que l'assentiment oral des enfants de moins de 12 ans, ont été recueillis.

h. Analyse des données

L'analyse descriptive des données obtenues et les comparaisons entre les groupes ont été réalisées par mes soins. L'analyse de l'association au DTC univariée et multivariée et celle du devenir, également univariée et multivariée, a été réalisée par le Dr E Curis du laboratoire de biomathématiques à la faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes.

L'analyse a donc débuté par une description des données obtenues, puis une vérification de leur type distribution (normale ou non). Nous avons ensuite comparé les groupes des enfants drépanocytaires à l'état stable, ceux en crise vaso-occlusive et les contrôles. Chez les patients à l'état stable, l'étude de la corrélation de chacun des paramètres à l'âge a été également réalisée.

L'analyse de l'association au DTC a été faite, dans le premier but de vérifier que l'association décrite dans la littérature entre certains facteurs et le DTC est bien retrouvée dans notre échantillon. Ensuite, la recherche de l'association entre d'autres facteurs recueillis dans cette étude et le DTC a été recherchée. Celle-ci a été réalisée en analyse univariée puis multivariée.

L'étude du devenir des patients et notamment de la survenue d'événements cliniques vasculaires a été ensuite réalisée. En premier lieu, une analyse univariée a recherché quels facteurs prédisaient la survenue d'événements cliniques. En second lieu, une analyse multivariée a recherché les paramètres permettant de décrire ce risque.

3. Résultats

Les principaux résultats obtenus dans l'étude DYVA sont :

- Chez les enfants drépanocytaires à l'état stable, nous confirmons les données de la littérature concernant un état d'activation de l'hémolyse, d'activation plaquettaire et un profil procoagulant. Ceci nous permet de valider notre population pédiatrique d'intérêt. Par ailleurs, nous observons un taux de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ circulants élevé.
- Il n'existe pas d'augmentation des marqueurs de lésion endothéliale : pas d'augmentation des cellules endothéliales circulantes contrairement à ce qui avait été précédemment publié chez l'adulte drépanocytaire, pas d'augmentation du VEGF. Nos résultats suggèrent plutôt une nette activation endothéliale, via notamment l'augmentation de la E-sélectine soluble et du VWF.
- Le taux de DTC anormal ou conditionnel à l'inclusion est faible, comparable à ce qui était attendu compte tenu des données de la littérature. En prenant la vitesse au DTC comme une variable continue, on retrouve la corrélation inverse connue avec l'âge et la corrélation positive avec les marqueurs d'hémolyse, ainsi qu'une association aux taux élevés de P-sélectine soluble (mais dépendante de l'âge). Ni les CEC, ni les paramètres de mécanique artérielle, ni la mesure indirecte de la biodisponibilité du NO ne sont associés au DTC. Dans le modèle multivarié, seul l'âge jeune prédit le DTC élevé.
- Concernant la survenue des événements vasculaires cliniques, ceux-ci sont relativement fréquents (35% des patients ont un événement pendant la période de suivi, de durée médiane 27 mois). Les événements neurovasculaires surviennent à un âge significativement plus jeune que les événements vasculaires périphériques. Les patients sous hydroxycarbamide ont plus d'événements vasculaires périphériques que les autres, indiquant probablement un sous-groupe de patients de gravité plus importante dès l'inclusion, et qui persiste malgré le traitement. Le taux de CD34+ à l'inclusion est le meilleur facteur prédictif d'événement vasculaire, toute origine confondue (neurovasculaire + périphérique), y compris dans un modèle multivarié. La précocité de survenue de l'événement est liée à un antécédent de DTC anormal à l'inclusion.

Ces résultats sont détaillés dans l'article ci-après. Cependant, nous n'avons pas inclus dans cette version de l'article les résultats des patients drépanocytaires explorés pendant une crise vaso-occlusive, qui seront néanmoins donnés après le manuscrit de l'article.

Article 2 :

CD34+ hematopoietic stem cell count is predictive for vascular event occurrence in sickle cell disease children.

Kossorotoff M, De Montalembert M, Lasne D, Brousse V, Curis E, Bertil S, Lacroix R, Smadja DM, Desguerre I, Bonnet D, Gaussem P

Manuscrit dont la soumission est prévue avant la soutenance de thèse.

CD34+ Hematopoietic stem cell count is predictive for vascular event occurrence in sickle cell disease children

Kossorotoff M^{1,2}, De Montalembert M^{3,4}, Lasne D^{1,5}, Brousse V³, Curis E^{4,6}, Smadja DM^{1,4,7}, Lacroix R⁸, Bertil S⁷, Desguerre I^{2,4}, Bonnet D^{4,10}, Gaussem P^{1,4,7}

1. Inserm UMR-S1140, Faculté de Pharmacie, Paris, France
2. AP-HP, Neuropédiatrie, French center for pediatric stroke, University Hospital Necker-Enfants Malades, Paris, France
3. AP-HP, Pediatric Sickle Cell Clinic, University Hospital Necker-Enfants Malades, Paris, France
4. Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
5. AP-HP, Laboratoire d'hématologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France
6. Laboratoire de biomathématiques, plateau iB², Faculté de Pharmacie, Paris, France.
7. AP-HP, Service d'hématologie biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France
8. Inserm UMR-S1076, UFR de Pharmacie, Aix Marseille Université, Marseille, France
10. AP-HP, M3C-Necker, Cardiologie Congénitale et Pédiatrique, Hôpital universitaire Necker Enfants malades, Paris, France

Funding sources: Dr M Kossorotoff received a grant 'Poste d'accueil' from the French Institute for Medical Research (Inserm) to support this work.

Introduction

Sickle cell disease (SCD) complications usually result from vascular involvement, proceeding from a combination of arterial wall injury, blood rheology modifications, and activation of circulating cells. Considering the huge burden of stroke and the elevated fatality rate in acute chest syndrome in SCD children, identifying relevant predictive markers for clinical vascular events are of utmost importance.

Whereas peripheral complications, i.e. bone/organ vaso-occlusive event (VOE), acute chest syndrome, pulmonary hypertension, or glomerular nephropathy, are attributed to microvasculature injury, cerebral complications are related to both microvasculature and large vessel involvement. It has been therefore hypothesized that separating peripheral and neurological complications would be more efficient to find specific predictive factors. Most of the studies addressed neurovascular risk markers. In particular, risk stratification according to Transcranial Doppler velocities has been demonstrated as a very efficient predictor for overt stroke occurrence [Adams N Engl J Med 1992], but not for silent cerebral infarct or peripheral vascular events occurrence [Wang J Pediatr Hematol Oncol 2000]. To date, neurovascular risk has been assessed by TCD annual screening, while peripheral vascular risk has been difficult to evaluate.

Conversely, further studies also demonstrated common risk factors for cerebral and peripheral vascular events, such as hemolysis, questioning this supposedly dichotomy [DeBaun Blood 2012]. In fact, as SCD is a systemic condition, it may be hypothesized that microvessel injury in the brain or in peripheral organs (including bone) would have the same determinants and that they would be similar for large vessel injury, as aggressive factors, excessive regenerative and scarring pathways may be common [Switzer Lancet Neurol 2006, Platt N Engl J Med 2005, De Montalembert Haematologica 2007, Ataga Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006]. Vascular risk in SCD children would therefore be considered as a global risk of neurovascular and peripheral events and would need a comprehensive view of the various involved elements to be assessed.

As TCD screening is the gold standard for assessing cerebrovascular risk in SCD children, the aims of this study were (i) to seek for associations between clinical, mechanical or biological parameters in SCD children and TCD results in order to delineate potential new markers associated with TCD, and (ii) to highlight a predictive marker for the occurrence of vascular events during an 18-month follow-up. We studied a large panel of markers, focusing on

coagulation and cell activation markers. We show for the first time a prognostic role for CD34+ cell in predicting the occurrence of a vascular (peripheral or cerebral) event.

Methods

Study populations

SCD patients at steady-state (SCD group)

Children with major sickle-cell disease syndromes (hemoglobin SS or hemoglobin S β^0 genotypes) regularly followed in the sickle-cell clinic of the University Hospital Necker-Enfants Malades, Paris, France and aged between 3 and 18 years old were consecutively included at steady state. Steady state was defined by the absence of a previous history of SCD complication leading to hospitalization or blood transfusion during the past 2 months. The inclusion period lasted from February 1st, 2011 to July 31st, 2012. All participants received standard age-appropriate care for SCD (penicillin, immunization, folic acid), including annual TCD between 2 and 16 years of age, as recommended [NHS guidelines 2009, NIH guidelines 2002]. (figure 1)

The following parameters were recorded at inclusion: history of vascular complications related to SCD (previous abnormal/conditional TCD, number of vaso-occlusive events, of acute chest syndrome, of splenic sequestration, history of priapism, pulmonary hypertension, SCD retinopathy, stroke, DVT, and of glomerular nephropathy), clinical parameters including modified Rankin score (mRS) evaluating the patient's functional autonomy, and ongoing treatment by hydroxycarbamide. Familial history of stroke or other vascular condition was also recorded.

Results of comprehensive biological testing, TCD and ultra-sound vascular mechanics assessment at inclusion, which are detailed further, were collected.

Controls

Control children, matched with the SCD group for age and ethnicity, were recruited because pediatric laboratory reference values for most of the studied biological parameters were missing, especially for children with African or Caribbean ethnicity. Controls were consecutively enrolled in the pediatric anesthesia, neurology or diabetes outpatient clinics. They had no reported cardiac or vascular disease, no history of infection, surgery or blood transfusion during the past 2 months, and a null hemoglobin S dosage. The same biological assessments were performed in controls and in SCD patients.

Ethical considerations

The local institutional ethical review committee approved the study protocol (registered protocol number 2011-01-04, Comité de Protection des Personnes Ile-de-France II). All parents and children over 12 years old gave written informed consent.

Vascular data at inclusion:

Transcranial Doppler: TCD procedure was performed annually with a Toshiba® Aplio 500 Ultrasound system; with a probe sector transducer PST-25BT (3 MHz frequency), as recommended [NHS guidelines 2009, NIH guidelines 2002]. Patients were classified in two categories at inclusion, i.e. normal or abnormal TCD, according to their closest routine TCD procedure results. Normal TCD group comprised patients with normal TCD according to STOP study / NIH criteria (Time Averaged Mean Maximum Velocity TAMMV in the middle cerebral artery, anterior cerebral artery and internal carotid artery $<170\text{cm/s}$) and patients with incomplete TCD procedure with available velocities within normal values [NHS guidelines 2009, NIH guidelines 2002]. TCD abnormal group comprised patients with STOP/NIH conditional (TAMMV $\geq 170\text{ cm/s}$) or abnormal (TAMMV $\geq 200\text{ cm/s}$) TCD. The maximum intracranial velocity measured during the same procedure was also recorded.

Peripheral vascular parameters: Recent echocardiogram data with tricuspid regurgitation velocity measure, an indirect marker of pulmonary hypertension, were reported. Blood pressure and vascular function parameters, such as intima-media thickness (IMT), mechanical properties of the common carotid artery (distensibility, elastic incremental module), endothelium-dependent vasodilation, and endothelium-independent vasodilation, were measured using previously described methods [De Montalembert Haematologica 2007, Tounian Lancet 2001].

Laboratory methods

Peripheral blood samples were collected at inclusion into EDTA, citrate and lithium heparinate pediatric tubes.

Biochemical, hematology and hemostasis exploration

Basic hematology and hemolysis parameters were recorded. Coagulation tests were performed on ACLTop (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA) using reagents from Siemens® for Prothrombin time (PT), Factor VIII, and Factor IX, from Diagnostica Stago® (Asnières, France) for activated-partial prothrombin time (aPTT, CKPrest), von Willebrand factor antigen (VWF), antithrombin, protein C, and protein S activities, and from Hyphen Biomed®

(Neuville-sur-Oise, France) for Factor VII+X coagulant activities. Free Protein S antigen was determined by ELISA (Asserachrom Stago®). The ABO blood group, which is known to influence VWF level, was also determined.

Thromboelastogram® (TEG Haemonetics, Brain tree, MA, USA) was performed using kaolin-activated citrated blood and provided the following data: R time in minutes (representing the enzymatic portion of coagulation), K time in minutes (representing clot kinetics), and maximum amplitude MA in millimeter (depending on platelet function/aggregation and fibrinogen level). A set of parameters generated from the mathematical first derivative of the standard TEG® tracing related to thrombin generation were obtained: time to maximum rate of thrombus generation (TMRTGG), maximum rate of thrombus generation (MRTGG), total thrombus generated (TGG).

ELISA assays

Endothelial and vascular markers were quantified by ELISA: D-Dimers (Asserachrom® D-DI, Stago), soluble Thrombomodulin (Imubind® Thrombomodulin ELISA Kit, American Diagnostica Inc), thrombospondin 1 (Quantikine® Human Thrombospondin-1 kit, R&D Systems), Vascular Endothelial Growth Factor (Quantikine® Human VEGF Immunoassay, R&D System), soluble E Selectin (Quantikine® Human sE-Selectin/CD62E, R&D Systems), soluble P Selectin (Human sP-Selectin/CD62P, R&D Systems).

Circulating Endothelial Cells

CECs were counted after immunomagnetic separation using a monoclonal antibody raised against the endothelial antigen CD146 as recommended and described elsewhere [Woywodt J Thromb Haemost 2006, Smadja Circulation 2009].

Circulating Progenitor Cells (CPCs) were quantified by flow cytometry. Total circulating CD34+ cells were measured. They were also converted into the absolute number of cells per 10⁵ lymphocytes using the white blood cell count obtained with an automated cell counter (LH750; Beckman-Coulter). This normalized expression allowed us to avoid the bias due to the elevated lymphocyte count observed during early childhood [Mauge Cytotherapy 2014].

Leukocyte-platelet complexes (LPC) were counted by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson) with CD45-CD41 labelling (Beckman Coulter and Caltag antibodies) and were

expressed as a percentage of total leukocytes, as described elsewhere [Le Manach PLoS One 2014].

Microparticles (MP) derived from blood cells and endothelial cells were quantified by flow cytometry using Annexin V labelling and cell-specific labelling. Platelet derived MPs (P-MP), erythrocyte derived MPs (Ery-MP), leukocyte derived MPs (L-MP) and endothelial cell derived MPs (Endo-MP) were quantified (mp/ μ L) using high-sensitivity flow cytometry, as previously described [Robert Atheroscl Thromb Vasc Biology 2012].

Nucleosome quantification, reflecting partly NETosis, was performed by ELISA (Cell death detection kit; Roche) as described by Fuchs et al. [Fuchs, Blood 2012]. One unit of nucleosomes referred to the average amount of nucleosomes quantified in plasma from the study pediatric controls.

Plasmatic arginine/ornithine ratio, which is thought to reflect NO biodisponibility (endogenous vasodilator), was measured by plasmatic aminoacids chromatography in SCD steady-state patients only, as pediatric norms were available in the lab.

Outcome evaluation

The follow-up period for SCD patients included at steady-state continued 18 months after the last inclusion, i.e. until December 31st, 2013. During this period, SCD management was performed as it is usually in our center, according to international guidelines [NHS guidelines 2009, NIH guidelines 2002]. TCD follow-up and clinical events were prospectively recorded.

Transcranial Doppler (TCD) follow-up: The first TCD procedure performed at least 9 months after inclusion and at steady-state was considered as 'Follow-up TCD'. Its maximum velocity and TCD category were noted. Patients who were started on transfusion program during the follow-up period were excluded from this follow-up TCD analysis, as chronic transfusion is known to modify TCD velocity.

Clinical outcome: Any significant vascular event occurring during the follow-up period was collected. Stroke, transient ischemic event, intracranial hemorrhage, cerebral venous thrombosis, TCD switching from normal to abnormal category, and intracranial aneurysm diagnosis were considered significant neurovascular events. Acute chest syndrome, priapism, acute splenic sequestration, femoral head osteonecrosis, proteinuria occurrence, and DVT were considered significant peripheral vascular events. Starting a transfusion program or

hydroxycarbamide treatment because of a neurovascular clinical sign or TCD abnormality during the follow-up period was also considered as a neurovascular event. Starting hydroxycarbamide treatment because of frequent VOE or repeated ACS/ASS during the follow-up period was considered as a peripheral event. On the contrary, bone and abdominal vaso-occlusive events not leading to treatment modifications were not considered as significant events in this study, as they are common in SCD patients. The time frame from inclusion to first vascular complication occurrence ('time to worsening') was determined.

Statistical analysis

All analyses were made using R and additional package coin [Hothorn Journal of Statistical Software 2008] for exact inference with ties when using non-parametric tests. Confidence intervals are given for a 95% confidence level; tests were made with a maximal type I error set at 5 % ($p < 0.05$). When needed, multiplicity corrections were made using the Bonferroni's method; p -values are always reported unadjusted, and the maximal significant p -value according to Bonferroni's method is then given.

Characteristics of the study populations: correlation of parameters with age was evaluated using Spearman's ranks correlation. Differences between steady-state patients and controls were assessed using Mann-Whitney test.

Association of parameters with TCD: associations with TCD maximal velocity were evaluated using Spearman's rank correlation coefficient for quantitative predictors and Kruskal-Wallis test for qualitative predictors. Association with TCD expressed as categories was done using logistic regression for quantitative predictors and Fisher's exact test for qualitative predictors.

Outcome analysis. Outcome was defined one the one hand from TCD worsening and on the other hand from clinical event (peripheral, cerebrovascular or both) occurrence. Predictivity of parameters for outcome was evaluated using the same approach, for univariate analyses. Then, a multivariate model, including selected parameters collected at inclusion was built for the outcome prediction. Parameters selection relied on both previously published data and results found in the univariate analysis. Age, reticulocyte count, ongoing treatment with hydroxycarbamide, history of abnormal TCD, soluble P-selectin count and CD34+ progenitor cell count at inclusion were thus retained. Significance of these parameters was tested using likelihood ratio tests for nested models theory. The ability of the final model to predict the outcome was checked using the area under the ROC curve, and the model sensibility and specificity.

Results

The study enrolled 108 SCD patients at steady state, 41 males and 67 females (sex ratio 0.61), aged 3.27–17.75 years old (mean 9.9) (figure 1). Twelve controls matched for age ($p=0.45$) and ethnicity were also included.

TCD results, clinical and biological parameters were recorded for all patients. As expected, SCD patients displayed significant higher levels of markers of hemolysis, platelet activation, leukocyte count, CD34+ hematopoietic stem cell count and total microparticles than controls (table 1). They presented a pro-coagulant profile with an increased whole blood coagulant activity, higher D-dimer, factor VIII, and VWF levels. They also had lower levels of coagulation inhibitors (table 1). Interestingly, SCD patients did not differ from controls in terms of circulating endothelial cells CEC ($p=0.88$), although an endothelial activation was suggested by the increase in soluble E-selectin ($p=0.0032$) level associated with a VWF increase. Cell nucleosomes, known as a leukocyte activation marker and a reflect of NETosis, did not differ between the two groups either.

Ultrasound vascular assessment was performed for 43/108 patients. SCD patients had altered endothelial-dependent vasodilation but none of them had pulmonary hypertension.

Associations between clinical, mechanical or biological parameters and TCD at inclusion

TCD exploration at inclusion

In the SCD group, 102 patients (94.4%) had normal TCD at inclusion (91 normal TCDs and 11 incomplete TCDs with available velocities within normal values). As expected from literature data [Adams Blood 2004], the group of patients with abnormal TCD at inclusion was a small sample, as 6 patients (5.6%) had abnormal TCD (3 conditional TCDs and 3 abnormal TCDs). We therefore analyzed associations with TCD velocity rather than TCD category for statistical reasons.

Association of patients' history and clinical findings with TCD velocity at inclusion

A history of abnormal TCD was recorded in 27 patients (25%), representing 18 conditional and 9 abnormal TCDs, and was not associated with TCD velocity at inclusion. Higher TCD velocity at inclusion did not associate either with any familial or personal history of cardiovascular or

neurovascular event. Concerning clinical findings at inclusion, univariate analysis showed that only younger age was associated with higher TCD velocity at inclusion ($rs=-0.46$, $p=0.0001$, $p\leq 0.0007$ was considered significant after Bonferroni's multiplicity correction), as previously published.

Association of biological parameters with TCD velocity at inclusion (Table 2)

Hemolysis parameters and blood cell count: As previously reported [Meier Am J Hematol 2014], hemolysis markers were associated with higher TCD velocity: lower hemoglobin count ($rs=-0.21$, $p=0.035$), higher reticulocyte count ($rs=0.28$, $p=0.006$), elevated LDH and transaminases (respectively $rs=0.31$, $p=0.0029$ and $rs=0.31$, $p=0.0019$). Higher TCD velocity associated with elevated leukocyte count ($rs=0.27$, $p=0.0057$) and elevated total CD34+ cells without reaching significance ($rs=0.18$, $p=0.072$). The association between reticulocyte count and CD34+ cell is show in figure 2.

Microparticles: No association between TCD velocity and total microparticles or subtypes was demonstrated.

Coagulation parameters: No association between TCD velocity and any parameter of activated coagulation or thrombin generation was demonstrated.

Vascular dysfunction parameters: Higher TCD velocity correlated with elevated soluble P-selectin and soluble E-selectin level (respectively $rs=0.31$, $p<0.0001$ and $rs=0.204$, $p=0.03$). No association with circulating endothelial cell count or serum arginine/ornithine ratio (exploring NO biodisponibility) was found.

Finally only reticulocyte count and higher soluble P-selectin level were associated with higher TCD velocities after multiplicity correction (respectively $rs=0.28$, $p=0.006$ and $rs=0.41$, $p<0.0001$, $p\leq 0.0007$ was considered significant) but higher P-selectin level and younger age were not independent.

Association of ultra-sound vascular assessment with TCD velocity at inclusion

No parameter of vascular mechanics was associated with TCD velocity at inclusion for the 43 patients with available data.

Multivariate analysis

In a multivariate logistic regression including age, reticulocyte count, soluble P-selectin level, total CD34+ cell count, and ongoing hydroxycarbamide treatment at inclusion, only younger

age predicted abnormal TCD or higher TCD velocity at inclusion (respectively OR=1.57 [1.13-2.67], $p=0.035$ and OR=1.95 [1.79-1.99], $p<0.0001$).

Predictive markers for TCD worsening and for the occurrence of vascular events during follow-up

Follow-up TCD velocity was available for 77/108 patients. Five patients had started a transfusion program during the study period and were therefore excluded from this part of the analysis. Four patients had no further TCD because of technical reason including skull thickness and 22 patients had no follow-up TCD or missing results.

Over the study period, clinical data were available for 104/108 patients, as four patients were lost of follow-up. Mean clinical follow-up was 27 months (range 18-34.6 months). 36/104 patients (35 %) had at least one neurovascular or peripheral vascular peripheral event during the follow-up period: 12 patients (11.5 %) had at least one neurovascular event, 25 patients (24%) had at least one peripheral microvascular event (one patient had both a neurovascular and a peripheral event) (figure 1). First neurovascular events were 4 ischemic strokes or TIAs, 1 hemorrhagic stroke, 1 cerebral sino-venous thrombosis, 4 transfusion programs started for abnormal TCD, 1 hydroxycarbamide treatment started for 2 consecutive abnormal (conditional) TCDs, 1 TCD switching from normal to abnormal. First peripheral events were the following: 13 acute chest syndrome episodes, 5 recent proteinuria discoveries, 2 priapism episodes, 1 acute splenic sequestration, 1 femoral osteonecrosis, 3 hydroxycarbamide treatment started for multiple VOE. Median delay for clinical event occurrence was 277 days from inclusion. Median age for all types of clinical event occurrence was 10.56 years old. Neurovascular events occurred at a younger age than peripheral vascular events (median age 6.45 vs 10.96 years old, $p=0.0071$).

Factors predicting TCD worsening

Higher reticulocyte count ($p=0.007$) and P-selectin level at inclusion ($p=0.007$) were associated with higher follow-up TCD velocity, the statistical link probably resulting from their strong relation with age (respectively $r_s=-0.24$, $p=0.01$ and $r_s=-0.38$, $p<0.0001$). Noteworthy, ongoing hydroxycarbamide treatment at inclusion was associated with higher follow-up TCD velocity ($p=0.018$, not significant after multiplicity correction).

Factors predicting clinical vascular events: CD34+ count at inclusion is the best predictive marker

Higher total CD34+ cell count was the best predictive parameter for vascular complication occurrence ($p=0.0004$). (Table 3) Several other clinical or biological parameters were weak predictors and were no longer significant after Bonferroni correction, namely higher TCD velocity at inclusion, history of abnormal TCD, higher incremental elasticity module, and higher reticulocyte count.

In the multivariate model, higher total CD34+ cell count was the best predictor for the occurrence of a vascular complication (OR 1.2 for 1000/mL increase, 95% CI [1.049-1.4], $p = 0.013$, sensitivity 52.9%, specificity 84.6% for a threshold of 8675/mL). Lower sE-selectin was a weaker but still significant predictor (OR 1.03 for 1ng/mL sE-selectin decrease, 95% CI [1.01-1.05], $p=0.0044$), but not independent from age as sE-selectin is negatively correlated with age ($rs=-0.42$, $p<0.0001$) and events occurred relatively late in childhood. See table 3 and figure 3.

When considering neurovascular events and peripheral events separately, as expected, abnormal TCD at inclusion and higher TCD velocity at inclusion (respectively $p=0.0005$ and $p<0.0001$) were highly predictive for neurovascular event occurrence but not predictive for peripheral events. Other expected parameters for neurovascular event occurrence were no longer significant after Bonferroni's multiplicity correction: younger age ($p=0.0022$), increased reticulocyte count ($p=0.0342$), and history of abnormal TCD ($p=0.001$). Parameters of altered peripheral artery mechanics, namely lower distensibility ($p=0.036$) and higher incremental module ($p=0.021$), were predictive for peripheral events, but were no longer significant after Bonferroni's multiplicity correction. Interestingly, patients treated with hydroxycarbamide at inclusion had significantly more peripheral vascular events during the follow-up period ($p=0.021$). Familial history of stroke ($p=0.6$) or personal history of sickle cell complications ($p>0.2$ for each type of complication) were not predictive for either type of complications. Interestingly, no coagulation parameter was predictive for the occurrence of neurovascular or peripheral events after multiplicity correction.

In the multivariate model, the only significant predictor for peripheral vascular complication was higher total CD34+ cell count (OR=1.23 for a 1000/mL increase, 95% CI [1.08-1.42], $p=0.0033$, sensitivity 52.2%, specificity 82.9% for a threshold of 9170/mL). See Figure 3.

Time to worsening

Parameters associated with shorter time to worsening were patient's history of neurovascular complication and history of abnormal TCD (respectively $p=0.0025$ and $p=0.016$), abnormal TCD at inclusion ($p=0.022$), increased leukocyte-platelet complexes ($p = 0.03$), and arterial wall lower distensibility ($p=0.045$).

In the multivariate model, the best predictors of shortened time to worsening (TTW) were lower soluble P-selectin dosage (TTW shortened by 11 days for each P-selectin decrease of 1 ng/mL, 95%CI [3.37-18.82], $p=0.0067$) and a history of abnormal TCD (TTW shortened by 203 days if the patient had a history of abnormal TCD at inclusion, 95%CI [43-363], $p=0.015$). As, sP-selectin and age were not independent ($r_s = -0.38$, $p<0.0001$) and clinical events occurred mainly in late childhood, sP-selectin may not be an independent predictor for shorter TTW.

Discussion

It is essential for physicians to have tools for risk stratification for SCD children, allowing therapeutic management adaptation in order to prevent severe complications, leading to pain, further sequelae or handicap. The two principal goals of this study were: (i) to explore clinical, mechanical and biological parameters in SCD children to seek for association with TCD, and (ii) to highlight a marker predictive for the occurrence of vascular events during an 18-month follow-up.

This study reproduced previous studies in terms of predictive factors for neurovascular events in SCD children, including abnormal TCD, younger age, increased hemolysis (elevated reticulocyte count), and history of stroke or abnormal TCD. Our results also provide new data concerning SCD vascular complications, as we used 3 original approaches. First, we performed a comprehensive assessment of various pathways implicated in vascular complications in SCD children, including classically and newly described parameters (such as nucleosomes and mechanical vascular parameters). Second, we chose to consider TCD as a continuous parameter, taking into account the maximal velocity, instead of the classical approach using the STOP/NIH TCD categories. This allowed us to perform predictive statistical analysis even with few abnormal TCDs, a finding which was expected [Adams Blood 2004]. Third, we chose to study both the occurrence of neurovascular events and peripheral events considering that they may have common pathophysiological determinants and risk factors.

The main result of our study is that CD34+ hematopoietic stem cell count is a common predictive factor for neurovascular and peripheral vascular complications, in univariate analysis and in a multivariate model, with a specificity of 85% using the 8675 cells/mL cut-off. Total CD34+ cell count was 3-fold higher in SCD children compared to controls ($p=0.0014$) (table1). The increase in CD34+ cells in SCD is likely to result in part from bone marrow stimulation due to chronic hemolysis and anemia. However, we show for the first time that the association between reticulocyte count and CD34+ cell count did not remain linear, i.e. CD34+ continued to increase when reticulocyte count had reached a steady-state (figure 2). This pattern suggests that other mechanisms than hemolysis are involved in CD34+ cell count increase, such as hypoxia and regenerative pathways. Hematopoietic stem CD34+ cells have been shown to be mobilized in hypoxic conditions upon SDF-1-induced mobilization, for example in the acute phase injury after stroke [Patel Stroke 2012], and this increase was found beneficial in this adult population. However, CD34+ mobilization may have a double effect in vascular pathologies.

Circulating CD34+ cells indeed contains a scarce population of so-called endothelial progenitor cells, known to participate in endothelium regeneration and stabilization. On the contrary, CD34+ in high number or with blocked maturation (as it is the case in hypoxic conditions), may promote neointimal hyperplasia and arterial stenosis [Patel Stroke 2012, Wierenga PLoSOne 2014] and are associated with poorer prognostic in cardiac failure adult patients [Lee World J Stem Cell 2014]. This might explain why higher CD34+ cell count was predictive for clinical vascular events in SCD children.

This study gave further information about vascular dysfunction/ activation in SCD children. Interestingly, and contrary to what Solovey et al. found in adults with SCD [Solovey NEJM 1997], no CEC increase was found in steady-state SCD children compared to controls and CEC were not predictive for vascular events. To note, we used the recommended method, i.e. immune-magnetic separation assay [Woywodt J Thromb Haemost 2006] and provided results as median CEC count, as CEC count was not normally distributed and mean CEC count could lead to misinterpretation. Furthermore, no patient had pulmonary hypertension, a situation in which our group has found that CEC increase could reflect irreversible lesions [Smadja Circulation 2009]. To go further, we analyzed blood samples obtained from 10 SCD children during vaso-occlusive event (5 included in the present study and 5 other eligible patients) and did not find CEC increase either. Other parameters of arterial damage were of interest in this study. Vascular mechanical parameters reflecting a loss of arterial wall distensibility were found predictive for peripheral vascular event occurrence, but significance was limited by the number of patients. Nevertheless, the observation of mechanical changes since childhood is consistent with early atherosclerosis described in adult SCD patients [Bartolucci Curr Opin Hematol 2012].

As hypercoagulability is frequent in SCD children [Ataga Am J Med 2003], the question of its predictivity for vascular or thrombotic events is crucial for physicians, especially in surgery settings. Although hypercoagulability and thrombin generation activation were observed in more than 90% of our SCD children, they were not predictive for vascular event occurrence. Contrary to the literature, increased thrombin generation parameters in steady-state patients were not associated with further neurovascular event occurrence [Noubouossie Eur J Hematol 2013].

This study may have underestimated TCD worsening because of a limited follow-up (mean 27 months), as sickle-cell disease is a life-long condition and natural TCD velocity evolution when first examination is normal is not well known. This should not be a limitation for clinical events as the risk of stroke occurrence has been estimated about 50% within 2-3 years since abnormal TCD [Adams N Engl J Med 1992] and peripheral vascular events are more frequent. Another limitation could be that, for some parameters, pediatric norms had not been established at the time of our study and our control group was small. Finally, these results do not allow us to establish conclusions about the usefulness of further treatment strategies aiming at reducing vascular risk in SCD children, especially anticoagulant, antiplatelet prevention or selectin blockers. We found that patients treated with hydroxycarbamide at inclusion had more frequently peripheral vascular events and TCD velocity increase, suggesting a more severe disease not compensated by treatment. This may suggest closer follow-up for these patients.

Conclusion

Vascular risk in SCD children may be considered as a global risk of neurovascular and peripheral events as aggressive factors, excessive regenerative and scarring pathways may be common. CD34+ cell count is a promising marker of global vascular event occurrence in SCD children. A large prospective study including CD34+ count in the biological follow-up of SCD patients is warranted to validate our findings.

Acknowledgments: We thank Florence Desvard, Yann Brunel, Laurent Garcia, Aurélie Dumont, and Peggy Tournoux for their excellent technical assistance

Disclosures

Pr De Montalembert is a member of the Novartis speakers' bureau. The other authors disclose any potential conflicts of interest.

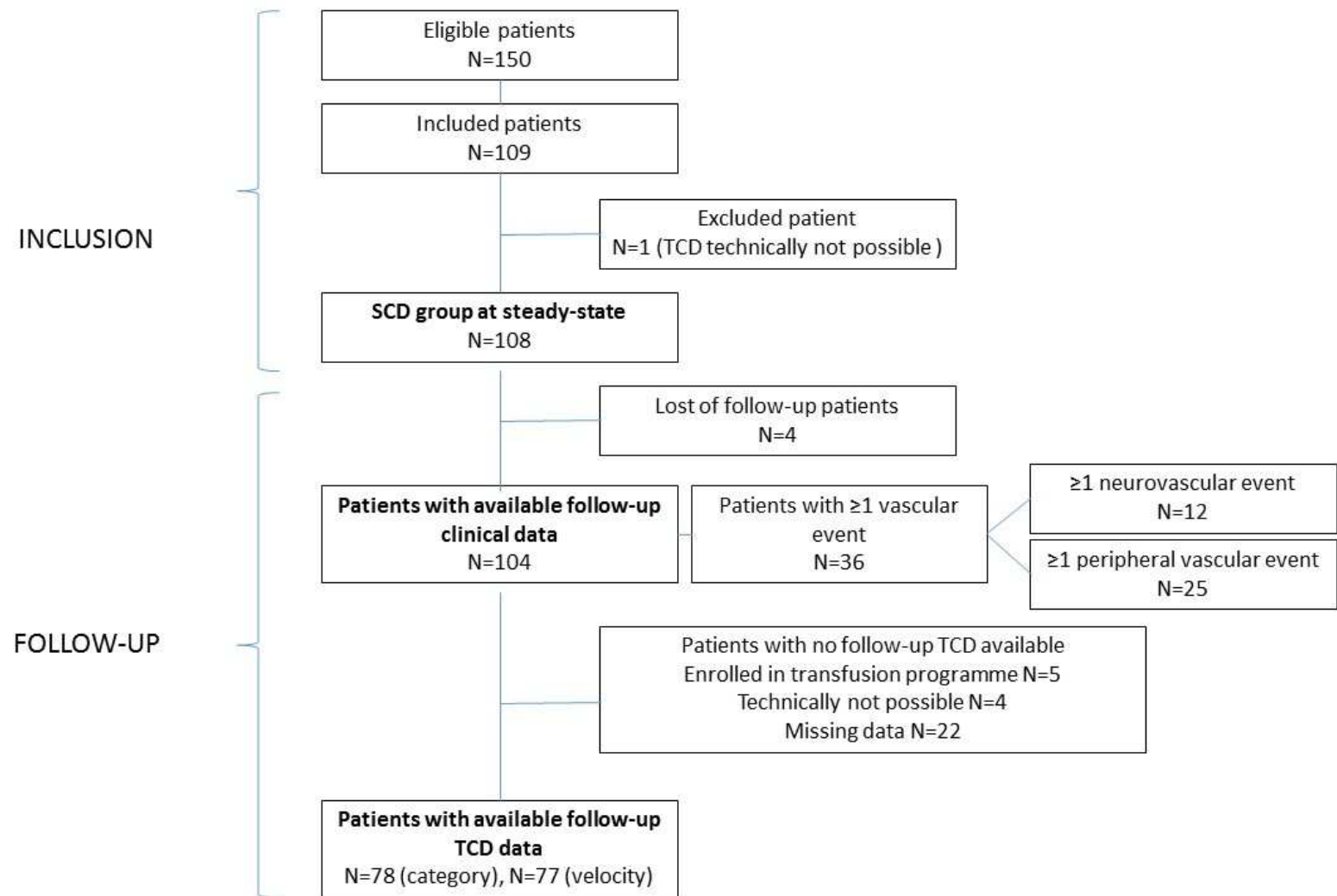


Figure 1: Flowchart of the study, TCD: transcranial Doppler

Parameter	SCA patients N=108	Controls N=12	<i>p</i>
Age (years)	9.94 ±3.96	9.18 ±4.45	ns
Sex ratio (M/F)	0.61	0.38	ns
Hemoglobin (g/dL)	8.3 ±1.2	11.7±0.9	<i>p</i><0.0001
Reticulocytes (x 10 ⁹ /L)	220 ±76	48.8 ±15.2	<i>p</i><0.0001
Erythrocyte-derived MP (/mL)	7780 ±15017	960 ±1006	<i>p</i>=0.0002
Platelets (x 10 ⁹ /L)	367.1 ±106.7	277 ±74	<i>p</i>=0.0039
Soluble P-selectin (ng/mL)	40.82 ±12.44	26.29 ±5.56	<i>p</i>=0.0002
Platelet-derived MP (/mL)	10324 [6521-17284]	6328 ±2201	<i>p</i>=0.0036
Leucocyte-platelet complex (% of total leukocytes)	43.23 ±13.73	38.41 ±13.99	ns
Total MP (/mL)	13320 [8773-24149]	7421 ±2724	<i>p</i>=0.0003
CEC (/mL)	1 [0-5]	1.5 [0-5]	ns
VEGF (ng/ml)	25.38 [25.38-30.77]	37.33 ±21.99	ns
Soluble E-selectin (ng/mL)	85.49 ±36.42	53.1 ±34.4	<i>p</i>=0.032
VWF (%)	167.1 ±62.8	92.6 ±24.6	<i>p</i>=0.0002
Leukocytes (x 10 ⁹ /L)	10.63 ±3.43	6.49 ±2	<i>p</i><0.0001
Total CD34+ cell (/mL)	6401 ±4854	2581 ±1491	<i>p</i>=0.0014
Nucleosomes (optic density/controls)	0.85 [0.56-1.37]	1	ns
TEG MA (mm)	71.55 ±5.19	65.4 ±3.7	<i>p</i>=0.0003
TEG K (min)	0.9 [0.8-1.2]	1.4 ±0.47	<i>p</i>=0.0059
TEG G (dyne/cm ²)	13106 ±3157	9990 ±1919	<i>p</i>=0.0012
TMRTGG (min)	13.88 [10.61-17.48]	7.14 ±2.52	<i>p</i>=0.0173
TGG (100*mm)	1342 ±369.7	1016 ±197	<i>p</i><0.001
D dimers (ng/mL)	1261 [757-1666]	514 ±800	<i>p</i><0.0001
aPTT (ratio patient/control)	0.94 ±0.11	1.05 ±0.13	<i>p</i>=0.0067
Factor VIII (%)	255 ±74	150 ±89	<i>p</i>=0.0001
Protein C activity (%)	65 ±16	87 ±14	<i>p</i>=0.0007
Protein S activity (%)	50 ±17	79 ±20	<i>p</i>=0.0004

Table 1: Biological features of the study populations at inclusion

Data are mean ±SD, or median [25-75 percentiles] for non-normally distributed parameters

MP: microparticle, VWF: von Willebrand factor antigen, CEC: circulating endothelial cells, VEGF: vascular endothelial growth factor, TEG: thromboelastogram, TEG MA: thrombus maximum amplitude, TEG K: time of clot formation, TEG G: thrombin generation, TMRTGG: time to maximum rate of thrombus generation, TGG: rate of thrombus generation. Tests: non-parametric Mann-Whitney and Fisher exact tests.

Parameter	<i>p</i>
Age (<)	<i>p</i><0.0001*
SS phenotype (+)	<i>p</i>=0.0017
mRS (≥2)	<i>p</i>=0.026
Hemoglobin (<)	<i>p</i>=0.035
Reticulocytes (>)	<i>p</i>=0.006
Erythrocyte-derived MP (>)	ns
LDH (>)	<i>p</i>=0.0029
Transaminases (>)	<i>p</i>=0.0019
Platelets (>)	ns
Soluble P-selectin (>)	<i>p</i><0.0001*
Platelet-derived MP (>)	ns
Total MP (>)	ns
CEC (>)	ns
VEGF (>)	ns
Soluble E-selectin (>)	<i>p</i>=0.03
Leukocytes (>)	<i>p</i>=0.0057
Total CD34+ cell (>)	ns (<i>p</i> =0.072)
Nucleosomes (>)	ns (<i>p</i> =0.08)
TGG (>)	ns
TMRTGG (<)	ns
D dimer (>)	ns
aPTT ratio (<)	ns
Factor VIII (>)	ns
Protein C activity (<)	ns
Protein S activity (<)	ns
Serum creatinine (<)	<i>p</i>=0.0033
Urinary excretion creat (<)	<i>p</i>=0.018
Arginin/ornithine plasmatic ratio (<)	ns

Table 2: Clinical and biological features associated with higher TCD velocity at inclusion

a. Univariate analysis

(<): association between parameter lower values and higher TCD velocity, (>): association between parameter higher value and higher TCD velocity, (+): association between parameter presence and higher TCD velocity

mRS: modified Rankin score, MP: microparticle, VWF: von Willebrand factor antigen, CEC: circulating endothelial cells, VEGF: vascular endothelial growth factor, TEG: thromboelastogram, TEG MA: TEG maximum amplitude, TEG K: TEG time of clot formation, TEG G: TEG thrombin generation, TMRTGG: TEG time to maximum rate of thrombus generation, TGG: TEG rate of thrombus generation

Raw *p*<0.05 is significant (bold). With Bonferroni's multiplicity correction, only *p*≤0.0007 remains significant (*)

Parameters recorded at inclusion (multivariate model)	Association with higher TCD velocity at inclusion, <i>p</i>
Age (<)	<i>p</i><0.0001*
Reticulocytes	ns
Soluble P-selectin	ns
Total CD 34+ cells	ns
Ongoing treatment with hydroxycarbamide	ns

b. Multivariate analysis

With Bonferroni's multiplicity correction, only $p \leq 0.01$ was considered significant (*).

Parameter	Global vascular events (neurovascular + peripheral)	Neurovascular events	Peripheral events
Age	ns	$p=0.0022$	ns
Hemoglobin	ns	ns	ns
Reticulocytes	$p=0.0327$	$p=0.0342$	ns
Platelets	ns	ns	ns
Soluble P-selectin	ns	ns	ns
Total MP	ns	ns	ns
CEC	ns	ns	ns
Soluble E-selectin	$p=0.0402$	ns	ns
Leukocytes	ns	ns	ns
Total CD34+ cell	$p=0.0004^*$	ns	$p=0.0019$
TMRTGG	ns	$p=0.0326$	ns
TGG	ns	ns	ns
D dimer	ns	ns	ns
CRP	$p=0.03$	ns	ns
History of abnormal TCD before inclusion	$p=0.0173$	$p=0.0014$	ns
History of frequent VOE	ns	ns	ns
History of priapism	$p=0.0485$	ns	$p=0.0161$
Abnormal TCD at inclusion	$p=0.0477$	$p=0.0005^*$	ns
TCD velocity at inclusion	$p=0.0178$	$p<0.0001^*$	ns
Familial history of cardiovascular event	$p=0.0206$	ns	ns
Incremental elasticity module	$p=0.036$	ns	$p=0.0215$
Vascular distensibility	ns	ns	$p=0.0366$

Table 3: Clinical and biological features associated with further clinical events occurrence

a. Univariate analysis

Raw $p \leq 0.05$ is significant (bold), with Bonferroni's multiplicity correction, only $p \leq 0.0007$ remains significant (*).

Parameters included in the multivariate model	Prediction of global vascular events (neurovascular + peripheral)	Prediction of neurovascular events	Prediction of peripheral vascular events
Age	ns	OR=0.61 [0.38-0.86] for 1 year older, $p=0.018$	ns
Reticulocyte count	ns	OR=2.03 [1.31-4.09] for $0.5 \cdot 10^9/L$ increase, $p=0.034$	ns
E-selectin dosage	OR=1.03 [1.01-1.05] for 1ng/mL decrease, $p=0.0044^*$	OR=1.04 [1.01-1.1] for 1ng/mL decrease, $p=0.027$	ns
Total CD34+ cell count	OR=1.2 [1.049-1.4], for 1000 cells/mL increase $p=0.013$	nd	OR=1.23 [1.08-1.42] for 1000 cells/mL increase, $p=0.0033^*$
Ongoing hydroxycarbamide treatment at inclusion	ns	nd	ns
History of abnormal TCD at inclusion	ns	OR=0.095 [0.01-0.54] for no history of abnormal TCD, $p=0.018$	ns

b. Multivariate model

Raw $p \leq 0.05$ is significant (bold), with Bonferroni's multiplicity correction, $p \leq 0.007$ remains significant (*)

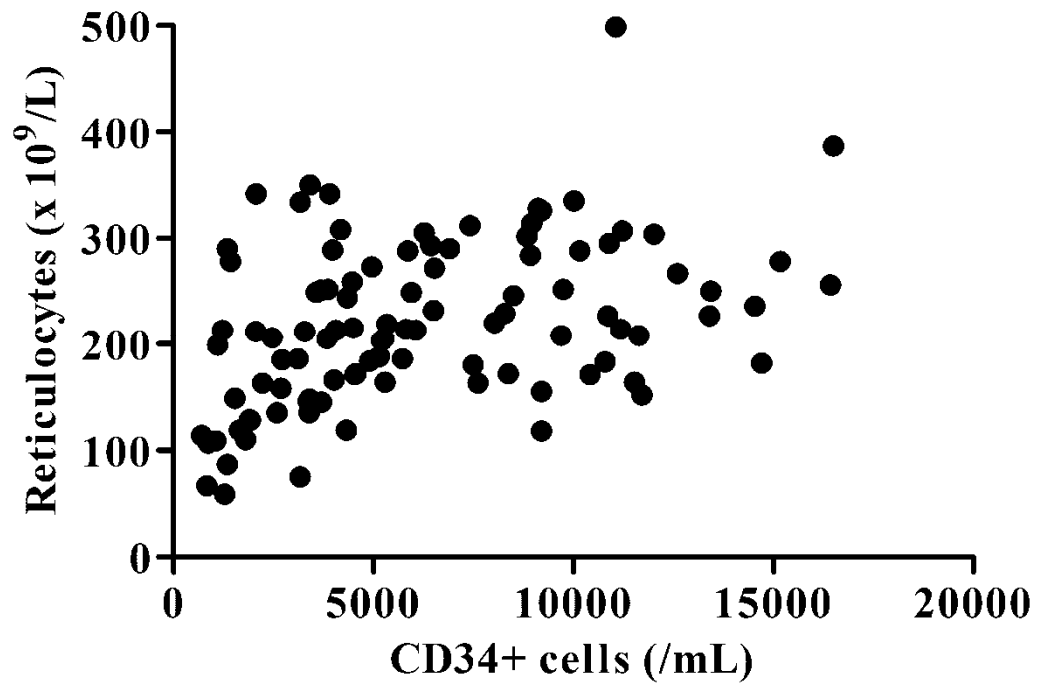
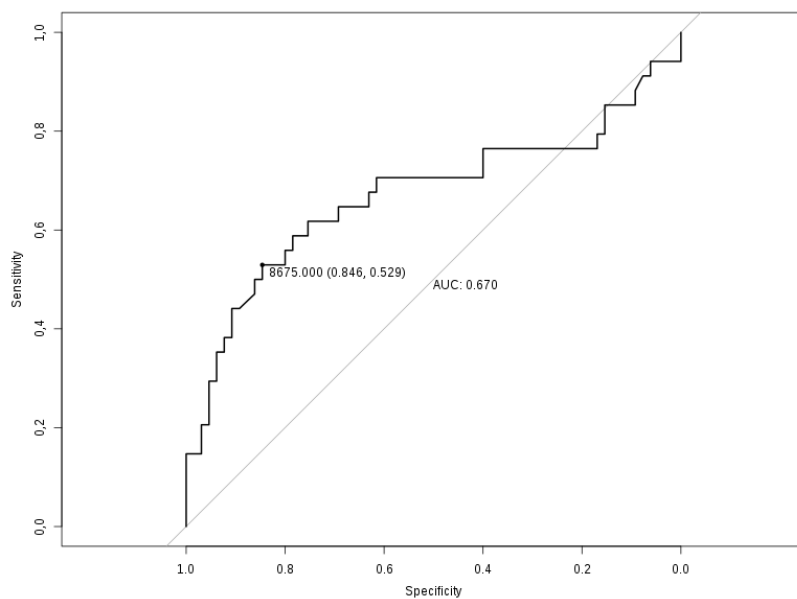
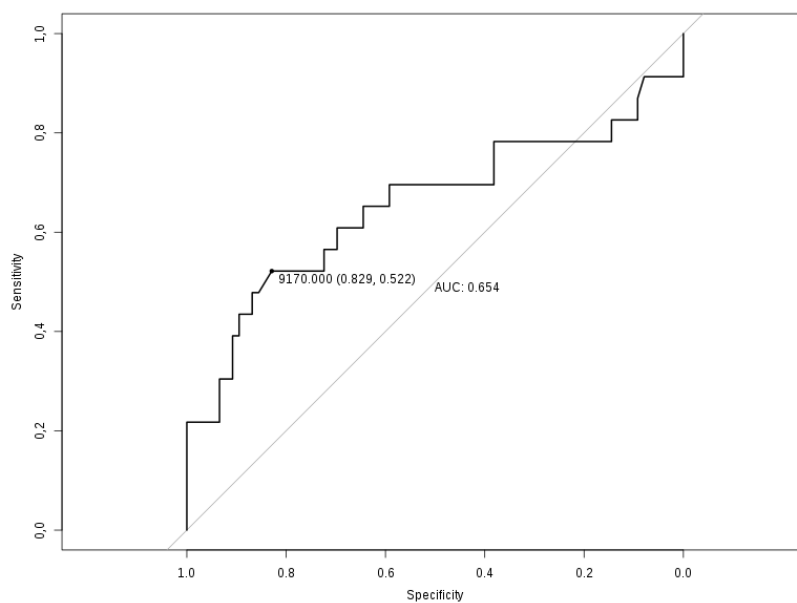


Figure 2: Association between CD34+ cell count and reticulocyte count. Association does not remain linear, suggesting other mechanisms than hemolysis involved in CD34+ increase.



A. PREDICTION OF GLOBAL (NEUROVASCULAR + PERIPHERAL) VASCULAR EVENTS



B. PREDICTION OF PERIPHERAL EVENTS 1

Figure 3: CD34+ cell count is predictive for clinical events occurrence (ROC curves)

Compléments de résultats : enfants drépanocytaires explorés pendant une crise vaso-occlusive

Dix enfants drépanocytaires ont été inclus pendant une hospitalisation pour CVO, 5 garçons, 5 filles, (sex ratio 1), d'âge médian 13,86 ans (6,37-17,39 ans) ce qui était légèrement supérieur à celui des patients inclus à l'état stable. Cinq étaient également inclus dans l'étude DYVA à l'état stable et 5 n'ont pas pu être inclus à l'état stable. Un patient a été prélevé lors de 2 épisodes aigus différents, donc 11 prélèvements ont été analysés.

Le groupe des patients prélevés en CVO présentait les caractéristiques suivantes par rapport aux patients à l'état stable (table 4) :

- Pas d'accentuation de l'hémolyse pendant la CVO (hémoglobine, réticulocytes, microparticules dérivées des érythrocytes non significativement différents)
- Augmentation du chiffre et activation des leucocytes : hyperleucocytose ($p=0,028$) et augmentation des microparticules dérivées des leucocytes ($p=0,058$), augmentation majeure des nucléosomes (taux multiplié par 10 environ, $p<0,0001$)
- Augmentation des facteurs pro-coagulants et marqueurs pro-thrombotiques : augmentation du VWF ($p<0,0001$), du facteur IX ($p=0,0055$), augmentation des D-dimères (taux moyen doublé, $p=0,0057$), consommation plaquettaire avec diminution du taux de plaquettes ($p=0,0052$) et des MP dérivées des plaquettes (taux moyen diminué de moitié, limite de significativité), ainsi qu'une diminution des amas leucoplaquettaires ($p=0,0041$) et des MP dérivées de l'endothélium ($p=0,016$)
- Pas de modification des paramètres de coagulation et de génération de thrombine au TEG®.
- Pas de modification des taux des cellules souches hématopoïétiques CD34+

parameter	SCD group (n=108)	VOE group (n=11)	Steady-state vs VOE
Age (years)	9.94 ±3.96	12,39 ±3.86	p=0.049
Hemoglobin (g/dL)	8.3 ±1.2	8,2 ±0.54	ns
Reticulocytes (x10 ³ /mL)	220 ±76	237 ±150	ns
Erythrocyte-derived MPs (/mL)	7780 ±15017	2045 ±2138	ns
Platelets (x10 ⁹ /L)	367.1 ±106.7	271 ±113	p=0.0052
Soluble P-selectin (ng/mL)	40.82 ±12.44	41.42 ±11.43	ns
Thrombospondin 1 (ng/mL)	1591 [1259-2192]	1491 ±662	ns
Platelet-derived MPs (/mL)	10324 [6521-17284]	6990 ±3756	p=0.052
Leukocyte-Platelet complexes (%)	43.23 ±13.73	27.03 ±14.94	p=0.0041
Total MPs (/mL)	13320 [8773-24149]	9239 ±5403	p=0.04
CEC (/mL)	1 [0-5]	2 [0.5-21.5]	ns
VEGF (ng/mL)	25.38 [25.38-30.77]	37.3 ±8.16	p=0.026
Soluble E-selectin (ng/mL)	85.49 ±36.42	72.93 ±29.2	ns
Endothelium-derived MPs (/mL)	87 [50.5-162.5]	44 ±22.38	p=0.016
Thrombomodulin (ng/mL)	3.31 ±0.5	3.13 ±0.45	ns
VWF (%)	167.1 ±62.8	232.6 ±61.9	p<0.0001
Leukocytes (x10 ⁹ /L)	10.63 ±3.43	12.65 ±2.88	p=0.028
Total CD34+ cells (/mL)	6401 ±4854	5818 ±5021	ns
Leukocyte derived MPs (/mL)	37 [15.5-61]	160.1 ±110.5	p=0.0058
Nucleosome (optic density/controls)	0.85 [0.56-1.37]	11.26 ±6.62	p<0.0001
TEG MA (mm)	71.55 ±5.19	70.58 ±5.06	ns
TEG K (min)	0.9 [0.8-1.2]	1.03 ±0.22	ns
TEG Angle	75.7 [73.2-78.5]	72.83 ±5.57	ns
TEG G	13106 ±3157	12441 ±2931	ns
MRTGG (dcs)	12.88 [10.61-17.48]	13.6 ±4.1	ns
TMRTGG (min)	13.88 [10.61-17.48]	5.7 ±1.1	ns
D Dimers (ng/mL)	1261 [757-1666]	2411 ±932	p=0.0057
Prothrombin time (%)	87.32 ±10.91	81.89 ±16.56	ns
TCK ratio	0.94 ±0.11	0.94 ±0.08	ns
Factor VIII (%)	255 ±74	280 ±78	ns
Factor IX (%)	101.7 ±15.2	126.4 ±26.5	p=0.0055
Factor VII + X (%)	66 ±12.5	60 ±20.7	ns
Antithrombin activity (%)	106 ±13	111 ±22	ns
Protein C activity (%)	65 ±16	66 ±17.8	ns
Protein S activity (%)	50 ±17	46 ±18.6	ns

Table 4 : Comparaison des patients drépanocytaires inclus à l'état stable (SCD group), des témoins et des patients en crise

Les paramètres sont exprimés par leur moyenne ± déviation standard ou médiane [25^{ème} - 75^{ème} percentile] pour les paramètres de distribution non normale.

4. Discussion, perspectives

Le DTC est intéressant dans la prédiction d'événements vasculaires chez l'enfant drépanocytaire s'il est pathologique

Le DTC est un excellent outil de stratification du risque neurovasculaire chez les enfants drépanocytaires. Cependant, il a ses limites, à la fois pour la prédiction de survenue des infarctus cérébraux, mais aussi parce qu'il n'est pas un bon outil de prédiction des événements vasculaires périphériques. Comme la drépanocytose est une maladie systémique, puisque touchant des cellules sanguines circulantes, on pouvait imaginer des complications similaires au niveau cérébral et périphérique. L'expérience clinique et les études publiées ont montré, comme cela a été discuté dans la partie introductive « objectifs », qu'en réalité il existe des atteintes des petits vaisseaux dans la plupart des organes, mais aussi des gros vaisseaux au niveau cérébral, qu'un profil hémolytique est plutôt associé à des événements neurovasculaires et un profil hypervisqueux à des événements occlusifs microvasculaires.

Même pour la prédiction des infarctus cérébraux, le DTC précédant l'infarctus cérébral peut être normal et ce n'est pas toujours celui qui a la vitesse la plus élevée dans l'histoire du patient. Autant lorsque le DTC est anormal, il a été montré que le risque d'infarctus cérébral de l'enfant est élevé, environ 50% dans les 2 ans qui suivent ce résultat anormal, autant le risque d'infarctus et surtout le risque d'évolution vers un DTC anormal est plus difficile à prédire. En reprenant les données du bras « standard care » (c'est à dire à l'époque pas de programme transfusionnel sur DTC anormal) de l'étude STOP, qui a inclus plus de 2000 enfants drépanocytaires avec étude de leur DTC, Adams a pu estimer l'évolution « naturelle » du DTC chez les enfants drépanocytaires. Il a montré que 9.4% des enfants avec DTC normal évoluent vers un DTC anormal pendant un suivi de 4 ans (10). Ce sont les sujets les plus jeunes (moins de 10 ans) chez qui le risque d'évolution vers un doppler pathologique est le plus important, ainsi que ceux qui sont dans la fourchette supérieure de la normale, ce qui est un argument supplémentaire pour utiliser la vitesse au DTC comme une variable continue, même si ce n'est pas l'habitude. Ainsi, un patient de 2 ans avec un premier TCD normal a 4% de risque d'avoir un TCD pathologique dans les 12 mois qui suivent, alors que ce risque passe à 50% si le premier doppler est conditionnel (10). Ainsi, un DTC normal chez un enfant jeune exclut moins le risque d'infarctus cérébral qu'un DTC normal chez un enfant de plus de 10 ans, même s'il s'agit de son premier DTC (enfant venant d'Afrique par

exemple). Ces données ont été confirmées pour les enfants les plus âgés par l'étude de Bernaudin, qui montre sur une cohorte cette fois prise en charge selon les recommandations actuelles, l'absence de premier DTC pathologique après 10 ans (131).

Par ailleurs, la répétition des DTC (mais qui va de pair avec l'accroissement de l'âge, donc n'est peut-être pas une donnée indépendante) permet d'affiner le risque. Le risque de passage à un doppler pathologique chez un patient ayant 2 DTC normaux est bas (1.8%) dans l'étude d'Adams. Aucun enfant ayant eu au moins 4 DTC n'a eu de « conversion » (passage d'un TCD normal à un TCD pathologique) après 3 DTC normaux. Par ailleurs, 4 et 15% des patients ayant un DTC pathologique à une des 3 premières évaluations ont eu par la suite un TCD normal sans mise en route d'un programme transfusionnel (certains ont pu être traité par hydroxyurée, la donnée n'était pas colligée) (10).

Ainsi, ces études pointent du doigt le problème de l'intérêt du DTC, qui est extrêmement utile lorsqu'il est pathologique (soit pour <10% d'une population d'enfants drépanocytaires à un temps t (10)) puisqu'il prédit un risque fort ou lorsqu'il est normal après l'âge de 10 ans, puisqu'il prédit un risque très faible. Comme pour beaucoup de paramètres, la zone intermédiaire reste d'une utilité clinique à court terme, jusqu'au prochain DTC annuel. Notre étude retrouve les mêmes résultats, avec un pourcentage faible de DTC anormaux et des événements, y compris neurovasculaires, qui surviennent chez des enfants avec DTC normal l'année précédente.

Rôle des CD34+ dans la prédiction des événements vasculaires et lien avec leur fonction et origine

Nos résultats mettent en évidence un rôle prédictif de l'élévation du compte des cellules souches hématopoïétiques CD34+ à l'inclusion pour la survenue des événements vasculaires dans notre population d'enfants drépanocytaires. L'augmentation des CD34+ aurait pu être exclusivement liée à la stimulation médullaire entraînée par l'hémolyse et l'anémie chronique en résultant. Cependant, nous avons montré que la relation entre cellules CD34+ et réticulocytes n'était pas linéaire et que les CD34+ continuaient à augmenter après que les réticulocytes atteignent un plateau. Cette augmentation est donc également liée à d'autres mécanismes. L'hypoxie chronique est un facteur d'augmentation des cellules souches hématopoïétiques. Cela a été montré en situation d'hypoxie aiguë et subaiguë (132). Chez nos patients, nous n'avons pas retrouvé de lien avec la saturation capillaire en oxygène. Dans la littérature concernant la drépanocytose, une saturation artérielle en oxygène diminuée est associée à des

vitesse augmentée au DTC. La désaturation artérielle est fréquente dans la drépanocytose, due à un déplacement vers la droite de la courbe de dissociation de l'oxygène à l'hémoglobine due à l'anémie chronique et aux propriétés de l'hémoglobine falciformée en solution. La désaturation chronique a été discutée comme facteur de risque d'infarctus cérébral symptomatique chez les enfants drépanocytaires homozygotes, car l'hypoxie active les leucocytes, les érythrocytes, les cellules endothéliales, l'adhésion érythrocytaire, le relargage de médiateurs pro-inflammatoires et pro-adhésifs (35). L'hypoxie discutée ici dans le cadre de l'augmentation des cellules CD34+ serait plutôt une hypoxie tissulaire, qu'on ne retrouverait pas forcément sur le plan de la saturation capillaire mesurée en périphérie.

Une petite fraction des cellules souches hématopoïétiques est représentée par les cellules progénitrices endothéliales, qui partagent avec le progéniteur hématopoïétique une cellule souche CD34+ commune. La stimulation des cellules souches hématopoïétiques et surtout le blocage de leur différenciation, lié au SDF1, empêcherait la différenciation en cellule endothéliale. Le renouvellement des cellules endothéliales matures permet le maintien de l'intégrité de l'endothélium en situation d'agression aiguë ou chronique. Lorsque cette différenciation ne se fait pas, la maintenance de la couche endothéliale protectrice ne peut être assurée correctement. Au contraire, les progéniteurs favoriseraient également une néoprolifération intimale, menant à une hyperplasie intimale et donc augmentant le risque vaso-occlusif, notamment dans les petits vaisseaux. Ces lésions de prolifération intimale sont par ailleurs celles qui ont été décrites dans les pièces anatomopathologiques microvasculaires et macrovasculaires chez les patients drépanocytaires (cf partie Bibliographie). Ces éléments physiopathologiques pourraient expliquer qu'on retrouve dans notre étude une augmentation des CD34+ circulants prédictive d'événements vasculaires. Et en particulier, pour nos patients, il s'agissait majoritairement d'événements périphériques qui sont préférentiellement microvasculaires.

Profil des enfants drépanocytaires explorés pendant une crise vaso-occlusive (CVO)

Les résultats biologiques que nous avons retrouvés chez les enfants prélevés pendant une crise vaso-occlusive mettent en évidence un profil d'inflammation aiguë et d'activation leucocytaire, avec notamment un phénomène de NETose très important. Ce dernier paramètre n'avait pas été étudié chez les enfants drépanocytaires et, même s'il existe une hyperleucocytose à l'état stable, on ne retrouvait pas de phénomène de NETose chez les enfants à l'état stable. L'augmentation en CVO est en faveur de

l'activation du phénomène en situation d'activation aiguë ou subaiguë, comme cela a été montré dans d'autres pathologies (infection, microangiopathie thrombotique subaiguë) (81). Si l'hémolyse et l'hypercoagulabilité ne sont pas modifiées en situation de CVO, une consommation des plaquettes est observée, cohérente avec le mécanisme de microthrombi multiples invoqué dans la physiopathologie de la CVO. L'absence de modification du taux des cellules souches hématopoïétiques CD34+ peut être expliquée par le fait que l'hémolyse n'est pas accentuée. Cependant, compte-tenu des phénomènes de micro-infarctus locaux dans la CVO, osseux ou d'organe, liés aux multiples occlusions microvasculaires, il aurait pu être logique d'observer une augmentation de ces cellules CD34+ en réponse à l'hypoxie locale. Nos patients ayant été prélevés assez précocement après le début de leur CVO (moins de 72h), il est possible que notre prélèvement ait eu lieu trop tôt pour objectiver la mobilisation de ces cellules souches.

Perspectives

Les résultats que nous avons trouvés concernant le rôle prédictif des cellules CD34+ doivent être confirmés par des études prospectives à plus grande échelle, étudiant la prédictivité des cellules CD34+ dans la survenue des complications microvasculaires et neurovasculaires de la drépanocytose. Il est en effet intéressant de disposer d'un marqueur de risque facilement dosable chez ces patients et son rôle pourrait être complémentaire de celui du DTC. Il serait également intéressant d'objectiver s'il existe une mobilisation de ces cellules souches lors d'événements accentuant l'hypoxie localement, comme les CVO. Le lien de ce paramètre aux événements vasculaires ouvre des perspectives intéressantes sur le plan physiopathologique quant à l'activation endothéliale, le rôle de l'hypoxie chronique, la stabilisation de l'endothélium par les nombreux acteurs circulants, dans une situation d'agression chronique ou aiguë. De nouveaux axes thérapeutiques pourraient voir le jour pour tenter de stabiliser ces différents facteurs lésionnels.

II. Les céphalées chez l'enfant drépanocytaire : un reflet de la vasculopathie cérébrale ?

1. Contexte et objectifs

Les céphalées récurrentes et la migraine sont fréquentes dans la population générale. Les taux de prévalence varient selon les définitions utilisées et l'intervalle de temps considéré par le questionnaire, de 6 à 15% des adultes interrogés pour la migraine et jusqu'à 40% pour les céphalées de tension (133–135). Les céphalées les plus sévères sont fréquemment associées à d'autres plaintes douloureuses : arthralgies, cervicalgies, lombalgies, douleurs de l'articulation temporo-mandibulaire (134).

Chez l'enfant, la distinction entre céphalées récurrentes, par exemple céphalées de tension, et migraine est souvent plus difficile que chez l'adulte du fait des limitations de l'interrogatoire visant à décrire les céphalées. La sémiologie de la migraine de l'enfant pouvant différer de celle de l'adulte, les critères de migraine de l'International Headache Society (IHS) ont été adaptés pour la pédiatrie (table 5). Malgré cela, la prévalence de la migraine et des céphalées récurrentes chez l'enfant reste peu précisément établie, mais les chiffres publiés sont toutefois proches de ceux observés chez l'adulte : de 9-20% dans les populations d'âge scolaire à 27-32% à l'âge de 13-14 ans pour la migraine à 54% pour les céphalées récurrentes (136,137).

A	Au moins 5 crises répondant aux critères B-D
B	Crise d'une durée de 1 à 48 heures
C	La céphalée présente au moins 2 des caractéristiques suivantes : <ul style="list-style-type: none">- Localisation qui peut être bilatérale- Pulsatile- Intensité modérée ou sévère- Aggravation par l'activité physique
D	Durant la céphalée, au moins une des caractéristiques suivantes : <ul style="list-style-type: none">- Nausée ou vomissement- Photophobie ou phonophobie
E	Exclusion par l'anamnèse, l'examen clinique et neurologique, éventuellement par des examens complémentaires, d'une maladie organique pouvant être la cause de céphalées

Table 5 : Critères diagnostiques de migraine sans aura de l'International Headache Society (révisés pour la pédiatrie) 2004

En 2003, les critères diagnostiques internationaux ont été modifiés : la durée minimale de la crise est de 1 heure, soit beaucoup plus courte que chez l'adulte (4 heures)

Chez les patients drépanocytaires enfants et adultes, la prévalence de céphalées récurrentes reste néanmoins difficile à estimer précisément car, là aussi, la définition utilisée varie selon les études, de céphalées récurrentes sans précision à migraine selon les critères de l'International Headache Society (IHS).

Dans une étude pédiatrique, la prévalence des céphalées récurrentes (au moins un accès hebdomadaire) chez 251 enfants drépanocytaires (tous génotypes) versus non drépanocytaires (c'est-à-dire sans trait drépanocytaire) de même origine ethnique a été évaluée au moyen d'un questionnaire. Pour l'ensemble des enfants, la prévalence des céphalées augmentait avec l'âge, sans différence entre les drépanocytaires et les contrôles. Dans le sous-groupe des moins de 13 ans, la prévalence des céphalées était supérieure chez les drépanocytaires (138).

Il existe des facteurs associés à une prévalence plus élevée de la migraine dans la population générale, bien connus comme le sexe féminin, le stress/anxiété, et d'autres comme l'obésité. Des facteurs ethniques ont été également étudiés. Les premiers résultats montraient une prévalence de la migraine plus faible chez les adultes d'origine africaine, mais avec une intensité rapportée des céphalées plus importante (139,140). Ces données ont été remises en question, avec d'autres résultats évoquant plutôt un moindre recours aux soins et aux traitements chez les patients noirs en cas de céphalées, ainsi que des céphalées moins typiques de la migraine chez les patients noirs (133,134). Ces résultats ont été obtenus dans des études menées essentiellement aux USA et dans lesquelles l'intrication avec d'éventuels facteurs confondants (données socio-économiques et forte prévalence de l'obésité) était difficile à distinguer. Une étude réalisée en Afrique (Ethiopie) montrait, elle, une prévalence de la migraine égale à celle rapportée chez les Caucasiens (141). Il ne semble donc pas licite d'expliquer la sur-prévalence des céphalées chez les patients drépanocytaires par leur origine ethnique.

Une autre hypothèse qui peut être évoquée est celle d'une sensibilité particulière à la douleur chez ces patients douloureux chroniques. En effet, la drépanocytose est caractérisée par des accès douloureux qui peuvent être fréquents et quasiment toujours intenses (nécessitant l'utilisation d'antalgiques morphiniques de palier II ou III). Chez les patients ayant des douleurs chroniques, a été décrite une sensibilité particulière à la douleur (« sensibilisation centrale » ou central sensitization). Chez ces patients, la sensation douloureuse est ainsi facilement exacerbée, avec une allodynie possible, une moindre efficacité des traitements antalgiques. Cette sensibilisation centrale pourrait

expliquer l'association fréquente des céphalées avec d'autres plaintes douloureuses dans la population générale. De ce point de vue, chez les patients drépanocytaires avec accès douloureux osseux, abdominaux, il ne serait pas surprenant d'observer une prévalence des céphalées récurrentes plus élevée.

Un élément supplémentaire pouvant expliquer un excès de céphalées chez les enfants drépanocytaires pourrait être le retentissement d'une hypoxie ou d'une hypercapnie nocturne. Celles-ci peuvent être liées notamment à une hypertrophie amygdalienne. On sait en effet qu'un des symptômes classiques des apnées obstructives du sommeil est la présence de céphalées diurnes récurrentes. L'hypoxie nocturne a été retrouvée chez la moitié des enfants drépanocytaires dans une étude prospective et elle semble plus sévère que chez les non drépanocytaires (142,143). Elle semble également associée à un délai plus court de survenue d'un événement neurologique (144). L'amygdalo-adoïdectomie, qui permettrait de limiter les effets hypoxiques et hypercapniques a montré des résultats contrastés (144,145). Son indication reste néanmoins facile lorsqu'une hypertrophie amygdalienne symptomatique est observée chez un enfant drépanocytaire, sans que la relation avec les céphalées ait été clairement établie.

Au-delà de ces considérations, reste une question importante qui est celle du rapport entre les céphalées et l'atteinte vasculaire cérébrale chez les drépanocytaires. Il ne s'agit pas uniquement d'une question physiopathologique, mais également d'une question de prise en charge du patient face à des céphalées récurrentes si on considère le pronostic neurologique de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire. En effet, dans d'autres pathologies vasculaires cérébrales chroniques, les céphalées sont un symptôme fréquent de la maladie, rapporté à l'hypoxie cérébrale. Par analogie, dans la maladie de Moyamoya, les céphalées sont un signe fréquemment rapporté, notamment chez l'enfant. Il s'agit d'une vasculopathie cérébrale chronique progressive, avec sténose progressive des artères carotides internes et développement d'un réseau collatéral de néovaisseaux perforants, dans lequel il existe une hypoperfusion cérébrale. Les céphalées sont habituellement considérées comme un symptôme d'hypoxie cérébrale dans cette maladie et peuvent être améliorées par les procédures de revascularisation (146). Se pose donc la question pour les enfants drépanocytaires du lien entre céphalées et vasculopathie cérébrale, qui a été analysé dans plusieurs études chez des enfants drépanocytaires. Dans l'étude de Niebanck, les éléments associés aux céphalées récurrentes étaient un âge plus élevé, une fréquence élevée de crises vaso-occlusives,

des symptômes d'apnées obstructives du sommeil et une sténose artérielle intracrânienne détectée au DTC. Il n'y avait pas de marqueur de l'hémolyse ni de l'anémie associé à la prévalence des céphalées chez ces enfants, notamment le taux d'hémoglobine, de réticulocytes, d'hémoglobine F, de leucocytes et de plaquettes. Sur le plan vasculaire, 97 examens d'angio-IRM (sur 176 patients SS ou S β °) ont été étudiés et les auteurs ont montré une association entre sténose artérielle à l'angio-IRM et céphalées fréquentes. Bien que l'analyse ait considéré des patients de différents génotypes, transfusés ou non, avec antécédent d'infarctus cérébral ou non, les résultats restent identiques dans les analyses de sous-groupes. Les vitesses maximales au DTC ne sont pas significativement différentes entre le groupe « céphalées » et le groupe sans céphalées (138). La question reste posée de la signification des céphalées chez l'enfant drépanocytaire avec DTC normal : s'agit-il d'une manifestation neurovasculaire à considérer comme telle, avec les conséquences que l'on peut envisager ?

Relations entre migraine et micro-occlusions vasculaires

L'explication physiopathologique classique de la migraine reposait essentiellement sur la théorie du couplage neurovasculaire : la vasoconstriction dans une région cérébrale provoque une ischémie cérébrale transitoire avec un dysfonctionnement cérébral localisé correspondant aux symptômes de l'aura migraineuse. La vasodilatation qui suit stimule des terminaisons nerveuses de la paroi vasculaire de la voie trigéménée, et provoque la perception nociceptive des céphalées (147).

Cependant, d'autres éléments physiopathologiques ont été également décrits. En premier lieu, il a été montré que l'aura était liée à une vague de dépression corticale électrique (cortical spreading depression), entraînant une sidération neuronale régionale transitoire, dont le point de départ n'est pas forcément une vasoconstriction. Notamment, un vasospasme induit par l'endothéline¹ (vasoconstricteur sécrété par l'endothélium) ou une embolie gazeuse expérimentale dans une artère cérébrale ont pu induire une vague de dépression corticale. La vague de dépression corticale a été également observée dans la migraine sans aura et liée à la céphalée (135,147,148).

Par ailleurs, a été observée une prévalence plus élevée de la migraine, notamment la migraine avec aura, dans certaines pathologies, telles que la persistance du foramen ovale, le lupus, le syndrome des antiphospholipides (135). Ces pathologies ont en commun la circulation de microthrombi, soit formés de manière excessive dans les pathologies avec hypercoagulabilité (inflammatoire et/ou auto-immune), soit présents de manière anormale dans la circulation artérielle (foramen ovale persistant). Plusieurs

données observationnelles ont montré une réduction des accès migraineux après fermeture chirurgicale du foramen ovale chez des patients avec migraine sévère, mais cela n'a pas été confirmé par le seul essai contrôlé randomisé réalisé (135).

Une théorie de la migraine comme reflet d'une vasculopathie systémique coexiste donc désormais avec la théorie du couplage neurovasculaire cérébral, ou du moins la complète. Elle repose sur des arguments neurovasculaires : association indépendante des autres facteurs de risque entre migraine avec aura et risque d'AVC dans la population générale (risque x2 chez les migraineux, x3 chez les migraineux avec aura), fréquence des lésions de la substance blanche en IRM chez les migraineux (type leucopathie vasculaire). Elle repose en second lieu sur la mise en évidence de marqueurs d'activation et de dysfonction endothéliale plus élevés chez les migraineux et sur l'observation de la migraine comme point cardinal de pathologies endothéliales génétiques (CADASIL). Le troisième volet repose sur le lien entre microembolie et migraine (148,149). En effet, des données expérimentales récentes ont montré qu'une ischémie focale, modérée et transitoire pouvait déclencher une vague de dépression corticale, sans qu'il y ait nécessairement une lésion tissulaire permanente (figure 10).

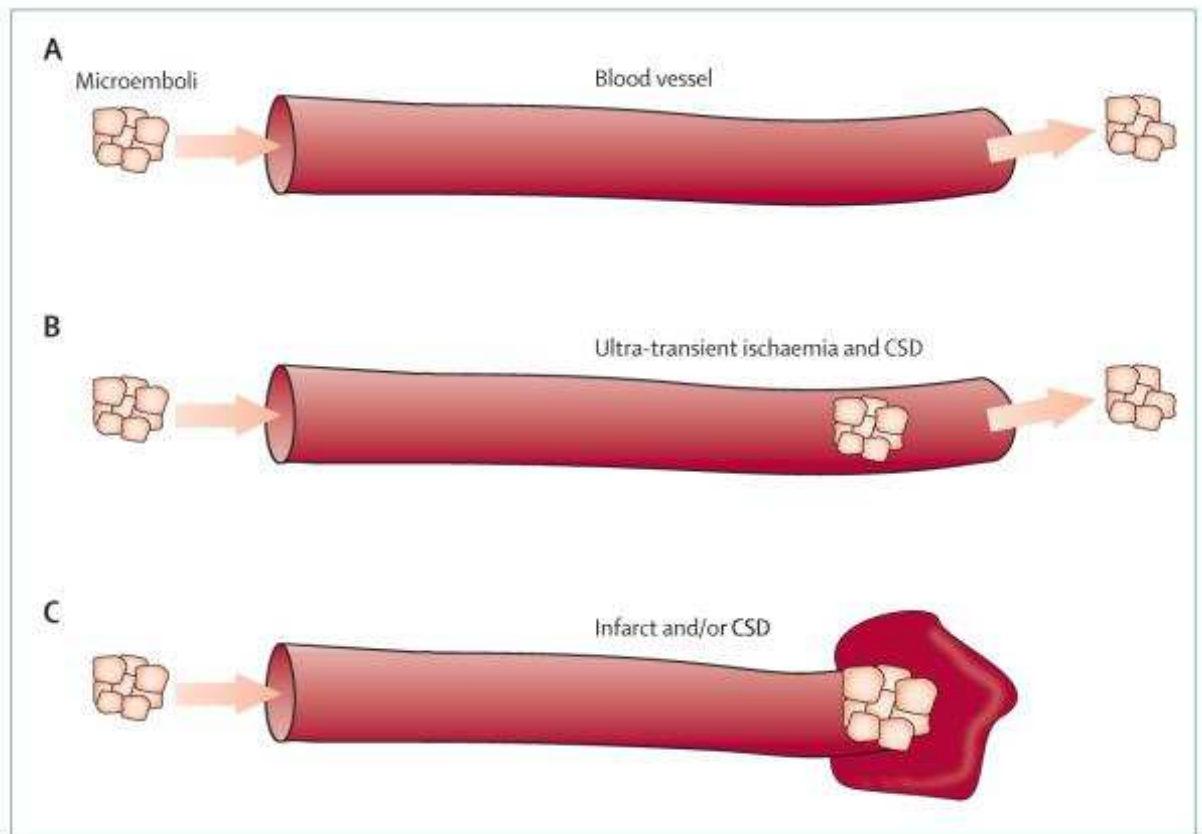


Figure 10 : Conséquences cérébrales de la circulation de micro-thrombi
 CSD : cortical spreading depression
 Tiré de Dalkara et al (148)

Nous avons voulu vérifier la possible association entre marqueurs de coagulation et céphalées chez ces enfants qui ont une hypercoagulabilité en lien avec la drépanocytose et une prévalence élevée des céphalées.

2. Méthode

Les patients inclus dans cette étude ancillaire étaient ceux de l'étude DYVA pour lesquels le paramètre concernant les céphalées était correctement renseigné.

A l'inclusion, l'interrogatoire comprenait un item « céphalées ». La question était posée à l'enfant et à ses parents de la présence éventuelle de céphalées récurrentes, caractérisées par au moins 2 accès céphalalgiques par mois. En cas de réponse positive, les céphalées étaient classées comme migraineuses si elles remplissaient les

critères pédiatriques de l'IHS, non migraineuses si elles ne les remplissaient pas ou par défaut si cette précision n'était pas disponible (interrogatoire limité, jeune âge).

Les patients avec/sans céphalées récurrentes et les patients avec/sans migraine étaient comparés pour l'âge, le taux d'hémoglobine, des facteurs de coagulation (facteur VIII, VWF) et inhibiteurs de la coagulation (protéine C, protéine S), des paramètres de formation et de dégradation de la fibrine (amplitude maximale au TEG, D-dimères), d'activation plaquettaire et endothéliale (chiffre des plaquettes, agrégats leucoplaquettaires, thrombomoduline soluble, E-sélectine soluble), des marqueurs d'inflammation (CRP, fibrinogène).

Le groupe sanguin (O ou non O) était pris en considération, car il est associé aux taux de VWF et par conséquent à celui de facteur VIII.

3. Résultats

Parmi les 108 enfants inclus dans l'étude DYVA, les données ont pu être exploitées pour 98 d'entre eux, soit 91% des patients de la cohorte. Nous avons retrouvé une prévalence élevée des céphalées récurrentes (N=43 patients, soit 43.9%), dont 33 patients migraineux (33.7% de l'effectif global). Comme publié précédemment, céphalées et migraines étaient associées à un âge plus élevé et à un taux d'hémoglobine plus bas (150).

Un profil biologique particulier a été mis en évidence chez les enfants drépanocytaires avec céphalées récurrentes, notamment migraineuses, par rapport aux patients non céphalalgiques. Ils présentaient en effet des taux plus élevés de facteur VIII et de VWF et des taux plus bas des inhibiteurs de la coagulation (protéine C et protéine S), sans différence notable pour les facteurs confondants (groupe O, marqueurs d'inflammation). Toutefois, les tests globaux de coagulation et les taux de produit de dégradation de la fibrine n'étaient pas différents entre céphalalgiques et non céphalalgiques, ce qui ne plaidait pas pour une augmentation de la formation de fibrine. Les marqueurs d'activation plaquettaire ou de dysfonction endothéliale n'étaient également pas différents.

Article 3 :

Imbalanced coagulation profile as a biomarker of migraine in children with sickle cell: is this a link with cerebral ischemia?

M. Kossorotoff, D. Lasne, V. Brousse, I. Desguerre, M. de Montalembert, P. Gaussem

J Pediatr. 2014 Sep;165(3):645-6

Lettre à l'éditeur en réponse à l'article de Dowling et al. Publiée.

Imbalanced coagulation profile as a biomarker of migraine in children with sickle cell: Is this a link with cerebral ischemia?

To the Editor:

Dowling et al have shown that recurrent headaches and migraine, common findings in children with sickle cell disease (SCD), are associated with low hemoglobin level and high pain rate, but not with silent cerebral infarction.¹ Experimental data also indicated that through neurovascular coupling, cortical spreading depression—an electrophysiological substrate for migraine—can be triggered by focal, mild, and transient ischemia, without an enduring tissue signature. Ultra-transient ischemia related to micro-thrombus formation and small vessel occlusion would thus be a trigger for migraine attack.² As SCD is associated with hypercoagulability,³ we addressed the association between the level of coagulation markers and headache in a cross-sectional study including 98 children with SCD (SS and S-beta-0 hemoglobin genotypes) aged 3-18 years, at steady-state. Of these, 43/98 (43.9%) had recurrent headaches, among which 33 (33.7%) were migraines according to the International Headache Society criteria. In line with the findings by Dowling et al,¹ headache or migraine was associated with older age and lower hemoglobin level. Interestingly, patients with headache displayed an imbalance between coagulation factors and inhibitors compared with patients without headache (Table). They had higher levels of coagulation factor VIII and von Willebrand Factor and lower levels of coagulation inhibitors protein C and S, without difference in potential confounding factors (blood group O, inflammation markers). Enhanced fibrin formation was not likely, as global coagulation tests and fibrin degradation product levels did not differ between groups, nor did markers of platelet activation and endothelial dysfunction. As described in other conditions associating enhanced thrombus formation/embolism and/or microvascular dysfunction and increased migraine prevalence (patent foramen ovale, antiphospholipid antibody syndrome, microvascular and inflammatory diseases...),^{2,4,5} in children with SCD, the level of hypercoagulability might play a role in headache/migraine. Repeated ultra-transient ischemic cerebral events may relate to migraine in these children, without visible infarction on brain MRI. Migraine in children with SCD might, thus, represent an underestimated clinical marker of disease severity.

M.K. is supported by National Institute of Health and Medical Research (French Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale). The authors declare no conflicts of interest.

Manoelle Kossorotoff, MD, MSc
Faculté de Pharmacie
Inserm UMR-S1140

French Center for Pediatric Stroke
and Pediatric Neurology Department
University Hospital Necker-Enfants Malades, AP-HP

Université Paris Descartes
Sorbonne Paris Cite

Dominique Lasne, PharmD, PhD
Faculté de Pharmacie
Inserm UMR-S1140

Hematology Department
University Hospital Necker-Enfants Malades, AP-HP
Paris, France

Valentine Brousse, MD, MSc
Pediatric Sickle Cell Clinic

Isabelle Desguerre, MD, PhD
French Center for Pediatric Stroke
and Pediatric Neurology Department
University Hospital Necker-Enfants Malades, AP-HP
Université Paris Descartes

Mariane de Montalembert, MD, MSc
Université Paris Descartes
Sorbonne Paris Cite
Pediatric Sickle Cell Clinic
University Hospital Necker-Enfants Malades, AP-HP

Pascale Gaussem, PharmD, PhD
Faculté de Pharmacie
Inserm UMR-S1140
Université Paris Descartes
Sorbonne Paris Cite
Hematology Department
Hôpital Européen Georges Pompidou
AP-HP, Paris, France
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.05.052>

References

1. Dowling MM, Noetzel MJ, Rodeghier MJ, Quinn CT, Hirtz DG, Ichord RN, et al. Headache and migraine in children with sickle cell disease are associated with lower hemoglobin and higher pain event rates but not silent cerebral infarction. *J Pediatr* 2014;164:1175-80.
2. Dalkara T, Nozari A, Moskowitz MA. Migraine aura pathophysiology: the role of blood vessels and microembolization. *Lancet Neurol* 2010; 9:309-17.
3. Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *Am J Med* 2003;115:721-8.
4. Tietjen GE. Migraine as a systemic vasculopathy. *Cephalalgia* 2009;29: 987-96.
5. Lip PZ, Lip GY. Patent foramen ovale and migraine attacks: a systematic review. *Am J Med* 2014;127:411-20.

Table. Biological profile in children with SCD, with and without recurrent headaches

	Variables (mean value)	No recurrent headache, N = 55	Recurrent headaches, N = 43	Migraine subgroup, N = 33	Headaches vs no headache, <i>P</i> value	Migraine vs no headache, <i>P</i> value
	Age, y	9.21	10.97	11.59	.0258	.0058
	Total hemoglobin, g/dL	8.51	8.06	7.92	.0258	.0085
Coagulation factors	Factor VIII activity, %	240.4	273.3	286.4	.0391	.0064
	von Willebrand factor activity, %	161	178	189	.2114	.0425
Coagulation inhibitors	Protein S activity, %	53	46	44	.049	.0064
	Protein C activity, %	68	62	62	.0481	.0554
Fibrin formation and degradation	TEG Kaolin Maximum Amplitude, mm	70.98	72.48	72.94	.356	.184
	D-dimers, ng/mL	1410	1424	1534	.9401	.6549
Platelet and endothelial activation	Platelet count, G/L	376.3	360.3	354.9	.4523	.3112
	Platelet-leukocyte aggregates, %	43.5	44.2	44.8	.7313	.62
	Soluble thrombomodulin, ng/mL	3.35	3.24	3.31	.482	.432
	Soluble E-selectin, ng/mL	84	86	91	.757	.385
Markers of inflammation	C-reactive Protein, mg/L	8.9	9.5	10.8	.745	.879
	Fibrinogen, g/L	2.6	2.5	2.6	.762	.651

Bold *P* values are < .05.

4. Discussion, perspectives

Notre étude a permis de mettre en évidence un profil de coagulation particulier chez les enfants drépanocytaires avec des céphalées récurrentes et particulièrement chez ceux qui sont migraineux. Ces enfants sont plus âgés, ont une anémie plus marquée, des taux plus élevés de FVIII et VWF et des taux plus bas de protéines anticoagulantes (protéines C et S). On retrouve également l'association à l'importance de l'anémie, qui avait été précédemment publiée.

Profil biologique de coagulation des patients de l'étude DYVA comparé aux données de la littérature concernant la migraine (hors drépanocytose) :

Plusieurs des facteurs que nous avons étudiés ont été préalablement associés à la migraine. Ces études ont été réalisées pour la plupart chez l'adulte, mais quelques données sont également disponibles pour l'enfant. Lorsqu'elles existent chez l'enfant, elles sont présentées de manière préférentielle dans la discussion ci-dessous.

Paramètres standards, facteurs de coagulation, protéines inhibitrices et mutations prothrombogènes: dans deux études pédiatriques, les taux de ces paramètres de coagulation et la prévalence des mutations prothrombogènes classiques (mutation facteur V Leiden, mutation facteur II, mutation MTHFR homozygote dans une étude, hétérozygote dans l'autre) ont été analysés chez 44 enfants israéliens et chez 50 enfants italiens tout venant (non drépanocytaires). Les paramètres standards de coagulation et les protéines inhibitrices (TP, TCK, protéine C et S, antithrombine, résistance à la protéine C activée) étaient normaux chez les enfants avec céphalées dans les deux études. Une augmentation du taux de facteur VIII était retrouvée chez les patients céphalalgiques. Les enfants céphalalgiques avaient significativement plus de mutations prothrombogènes que les témoins de même origine dans les deux études, mais les mutations qui prédominaient n'étaient pas les mêmes dans les deux études (151,152).

Agrégats leuco-plaquettaires, marqueurs d'activation plaquettaire : chez 72 patients adultes non drépanocytaires avec migraine sans aura comparés à des témoins, les ALP étaient augmentés entre les accès, ainsi que l'expression plaquettaire de la P-sélectine, témoin de l'activation plaquettaire (153). Nous n'avons pas retrouvé cette association avec des ALP élevés chez les enfants drépanocytaires de notre étude, suggérant une moindre participation de l'activation plaquettaire, qui est déjà élevée chez tous ces patients, dans le processus céphalalgique.

Facteur Willebrand : chez des femmes migraineuses, une élévation significative des taux de VWF a été retrouvée entre les accès, plus marquée chez celles qui avaient une migraine avec aura (154). Dans notre étude, on retrouve cette élévation du VWF, significative pour le sous-groupe migraine mais pas pour l'ensemble du groupe céphalées. Même si le FVIII et VWF sont significativement plus élevés chez les drépanocytaires migraineux, ils pourraient refléter une réaction inflammatoire plus intense. Cependant, nous n'avons pas retrouvé de différence du taux de CRP entre patients migraineux et non céphalalgiques. Les taux diminués des inhibiteurs de la coagulation pourraient suggérer une consommation de ces facteurs dans des microthrombi. Ceci reste une hypothèse, soutenue par une augmentation des D-dimères chez nos patients drépanocytaires par rapport à nos contrôles (mais sans différence significative entre les migraineux et les non-migraineux).

Activation endothéliale et modifications de la mécanique artérielle : les **progéniteurs endothéliaux circulants** (EPCs) ont été retrouvés augmentés chez un groupe migraineux par rapport à des contrôles. Il s'agissait d'un sous-groupe d'EPC (CD34/KDR+ CD62E+) (155). De la même manière, une élévation des **microparticules d'origine endothéliale** a été retrouvée chez 29 enfants migraineux avec aura (MA) par rapport à des contrôles. Les taux de MP endothéliales corrélaient avec la **rigidité artérielle**, mesurée par tonométrie et l'index d'augmentation ajusté sur le rythme cardiaque (156,157). De plus, une augmentation de la rigidité artérielle et une diminution de la capacité de vasodilatation endothélium-dépendante (FMD) a été retrouvée chez les migraineux par rapport aux contrôles (149). L'ensemble de ces résultats de la littérature plaide pour une implication endothéliale forte dans les phénomènes migraineux. Dans notre travail, l'étude des facteurs d'activation endothéliale ne montre pas d'élévation significative des marqueurs d'activation/lésion endothéliale chez les migraineux ou les céphalalgiques par rapport au reste de notre population d'enfants drépanocytaires (cellules endothéliales circulantes, CD34 totaux, MP totales et MP d'origine endothéliale, distensibilité artérielle, FMD, épaisseur intima-media). Compte-tenu de la modification de ces mêmes facteurs déjà présente à l'état stable chez l'ensemble du groupe des patients drépanocytaires par rapport au groupe témoins, il est possible qu'une sur-augmentation n'ait pu être démontrée faute de puissance statistique.

Ainsi, de nombreux facteurs physiopathologiques présumés de la migraine, et notamment de la migraine avec aura ont été évoqués dans la littérature en dehors de la drépanocytose. Ils sont résumés dans la figure 11. De manière intéressante, tous les éléments physiopathologiques cités dans ce schéma de physiopathologie générale sont

présents chez le drépanocytaire et pourraient participer à la forte prévalence de la migraine dans cette population.

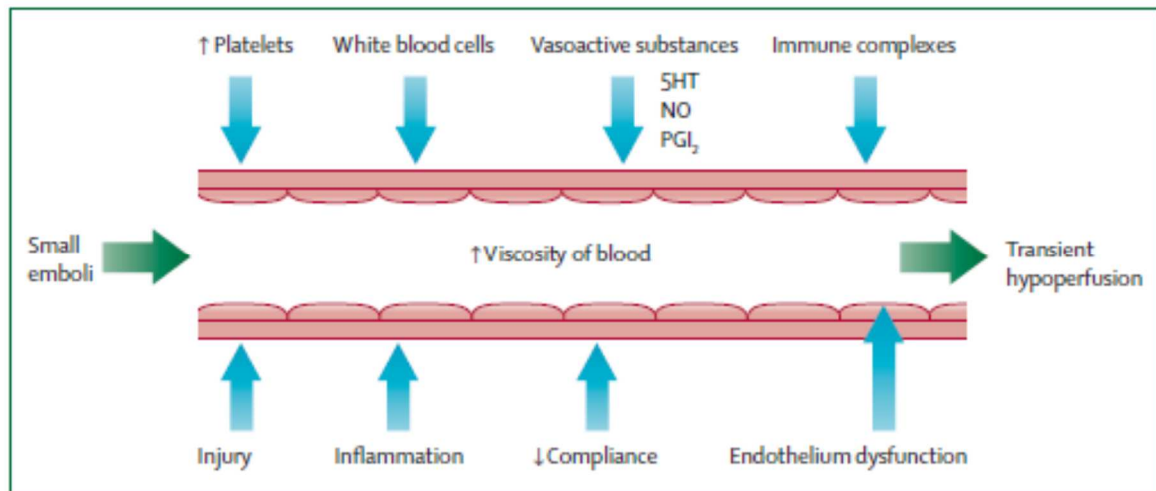


Figure 11 : Schéma physiopathologique de l'aura migraineuse et facteurs déclenchants de la vague de dépression corticale
Tiré de Dalkara et al (148)

Rapports entre migraine et risque d'infarctus cérébral chez l'enfant drépanocytaire

Nous avons publié ces résultats en réponse à l'article de Dowling et al., paru dans The Journal of Pediatrics en 2014, qui retrouvait comme facteurs associés à la migraine l'hémoglobine basse, la fréquence des crises vaso-occlusives, mais pas les infarctus silencieux sur l'IRM (150). En effet, selon la théorie des accès migraineux déclenchés par des ischémies ultra-transitoires, la survenue de ces accès ischémiques n'est pas forcément liée à la constitution de lésions pérennes, ce qui pourrait expliquer qu'elles ne soient pas vues en IRM. Cependant, le fait de retrouver un profil particulier de coagulation, plutôt pro-coagulant, encore plus marqué chez les enfants drépanocytaires migraineux qui ont déjà tous une hypercoagulabilité (cf supra), est un argument supplémentaire pour penser que leur migraine peut être liée à des événements ischémiques cérébraux. On peut ainsi penser, contrairement à ce qu'évoquaient Dowling et al., que la migraine chez l'enfant drépanocytaire puisse être un marqueur de risque neurovasculaire.

Cette hypothèse d'ischémies ultra-transitoires est cohérente avec des études précédentes qui ont montré qu'il existait fréquemment des épisodes ischémiques

périphériques infra-cliniques dans la drépanocytose à l'état stable. Objectivés par des fluctuations mineures de l'échelle de douleur et l'élévation périodique de paramètres inflammatoires et rhéologiques (cellules denses), ils étaient associés à la survenue ultérieure d'événements cliniques (CVO) chez des patients drépanocytaires adultes (158).

L'hypothèse des ischémies cérébrales ultra-transitoires semble également corroborée par les résultats de l'étude SIT (Silent Infarct Trial), publiés de manière quasi-concomitante de nos résultats (159). Cet essai multicentrique randomisé comparait l'incidence de nouvel infarctus silencieux (ou son augmentation de taille) ou d'infarctus cliniquement symptomatique chez des enfants drépanocytaires qui présentaient à l'inclusion un ou plusieurs infarctus silencieux (d'au moins 3mm) à l'IRM et un DTC normal, avec un bras observation (selon les recommandations actuelles) et un bras transfusions mensuelles. Les patients sous hydroxycarbamide étaient exclus. Les résultats montrent une incidence plus faible d'infarctus (silencieux ou symptomatique) dans le bras transfusion. Les facteurs associés à la survenue d'un nouvel infarctus sont : l'âge jeune, une réticulocytose importante et des céphalées récurrentes, ce dernier étant d'ailleurs le facteur associé à l'odds ratio le plus élevé (odds ratio 4.3, IC95% [1.5-13.6], $P=0.007$) (159). Ce dernier élément semble donc corroborer notre hypothèse des céphalées récurrentes qui seraient un marqueur de risque neurovasculaire chez les enfants drépanocytaires.

La présence de céphalées récurrentes est un élément clinique de recueil facile à l'interrogatoire, mais il est évident qu'il ne peut être utilisé seul pour prédire le risque neurovasculaire chez un enfant drépanocytaire. Des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer la place de ce paramètre dans le panel des outils de prédiction du risque d'infarctus cérébral chez ces enfants, en complément du doppler transcrânien, de l'IRM et des marqueurs biologiques.

III. Anévrismes intracrâniens et vasculopathie cérébrale drépanocytaire

1. Contexte et Objectifs

L'atteinte vasculaire cérébrale dans la drépanocytose est différente chez l'enfant et chez l'adulte.

La vasculopathie cérébrale **chez l'enfant** est une artériopathie chronique, progressive, de début précoce (avant l'âge de 10 ans), observée très majoritairement chez les SS et les S β °. Elle est sténosante et touche de manière très prépondérante la circulation antérieure (d'origine carotidienne), avec des lésions des terminaisons carotidiennes et de la partie proximale de leurs branches (artère cérébrale moyenne et artère cérébrale antérieure). Les conséquences en sont l'hypoperfusion cérébrale locale ou régionale, menant à des accidents ischémiques symptomatiques ou silencieux, des difficultés cognitives, des céphalées (cf. B.II). Comme elle est de début précoce, quasiment exclusivement avant l'âge de 10 ans, le doppler transcrânien de dépistage n'est actuellement recommandé que jusqu'à l'âge de 16 ans. Mais il y a également dans cette stratégie une part de méconnaissance de la vasculopathie cérébrale de l'adulte et de la transition enfant/adulte, même si des études longitudinales ou rétrospectives commencent à étudier le lien entre vasculopathie de l'enfant et de l'adulte. Chez l'enfant drépanocytaire, les hémorragies cérébrales sont rares et ne représentent dans la littérature qu'1/4 des AVC de cette population.

Chez l'adulte, sont rapportés deux profils de vasculopathie.

D'une part, il existe des **lésions vasculaires cérébrales menant à des conséquences ischémiques**. Il peut s'agir d'adultes ayant débuté une vasculopathie cérébrale drépanocytaire dans l'enfance, qui continuerait à évoluer ou qui s'aggraverait du fait de facteurs de risque qui augmentent avec l'âge et qui sont davantage prévalents chez les drépanocytaires (athérosclérose précoce, néphropathie, hypertension artérielle) ou bien il peut s'agir uniquement de lésions/d'accidents liés à ces facteurs de risque vasculaire plus présents chez l'adulte drépanocytaire. Une étude de cohorte réalisée au sein du centre de référence de l'hôpital Henri Mondor (APHP, Créteil) a comparé l'incidence des AVC chez les patients SS (ou S β °) et SC. Pour les infarctus cérébraux, on retrouve assez

logiquement chez les adultes SS un âge plus jeune lors du premier AVC, qui survient essentiellement dans l'enfance et avec un risque de récurrence important, alors que chez les SC le premier infarctus cérébral survient essentiellement à l'âge adulte (après 20 ans), n'est pas associé à une vasculopathie cérébrale drépanocytaire mais à des facteurs de risque vasculaires classiques (HTA, tabac, hypercholestérolémie, diabète, surpoids). Chez les SS, la récurrence est souvent précoce (68% inférieure à 5 ans après le premier épisode) et l'intervalle entre les récurrences diminue lorsque celles-ci se répètent (160).

D'autre part, et ce sont les plus fréquentes chez l'adulte jeune, sont décrites des **lésions vasculaires cérébrales menant à des conséquences hémorragiques**. Ces accidents hémorragiques peuvent avoir schématiquement deux origines : la complication d'une vasculopathie sténosante très sévère (syndrome de moyamoya avec rupture des néovaisseaux collatéraux) ou une hémorragie d'origine anévrysmale (qui peut parfois également s'observer dans un syndrome de moyamoya). La première origine est donc une complication hémorragique d'une vasculopathie sténosante. L'atteinte progressive des terminaisons carotidiennes et de leurs branches proximales, aboutit dans les formes sévères au syndrome de moyamoya avec le développement d'un réseau de néovaisseaux perforants collatéraux. L'hypoperfusion majeure conduit à des accidents ischémiques, le plus souvent dans l'enfance et la fragilité des néovaisseaux peut conduire à leur rupture, avec cette fois une hémorragie cérébrale (le plus souvent intraparenchymateuse ou intraventriculaire), qui est plutôt une complication de l'adulte. Parfois, un syndrome de moyamoya peut également se compliquer avec le développement d'un ou plusieurs anévrysmes, qui apportent leur risque supplémentaire d'hémorragie cérébrale. Dans la seconde origine, les hémorragies d'origine anévrysmales sont le plus souvent des hémorragies méningées ou parenchymateuses. Les hémorragies méningées dues à un anévrysme sont décrites chez l'adulte drépanocytaire, avec une prévalence estimée 100 fois supérieure à celle de la population générale, avec des patients en moyenne plus jeunes et qui présentent davantage d'anévrysmes multiples. Ces anévrysmes sont plus souvent situés sur la circulation postérieure (jusqu'à 50%) que chez les non drépanocytaires (161,162). Leur rupture peut être favorisée par des circonstances particulières, telles que les variations hémodynamiques lors de la greffe de moelle osseuse ou de la grossesse.

Ainsi, l'analyse épidémiologique permet d'observer une répartition des AVC chez le drépanocytaire avec, schématiquement, des accidents ischémiques dans l'enfance, des accidents hémorragiques chez l'adulte jeune et à nouveau des accidents ischémiques

chez l'adulte plus âgé, mais à un âge qui reste plus jeune que dans la population générale (figure 12) (75). L'observation de ces événements différents à des âges bien définis a conduit à l'hypothèse de mécanismes physiopathologiques distincts ou séquentiels (figure 13). Cependant, comme les accidents ischémiques et hémorragiques compliquent une même maladie, la drépanocytose, ont été également évoqués des éléments mécanistiques communs. Ces facteurs d'agression endothéliale ont été détaillés dans les parties précédentes de ce travail. Ce serait alors le tissu vasculaire qui réagirait différemment à ces agressions.

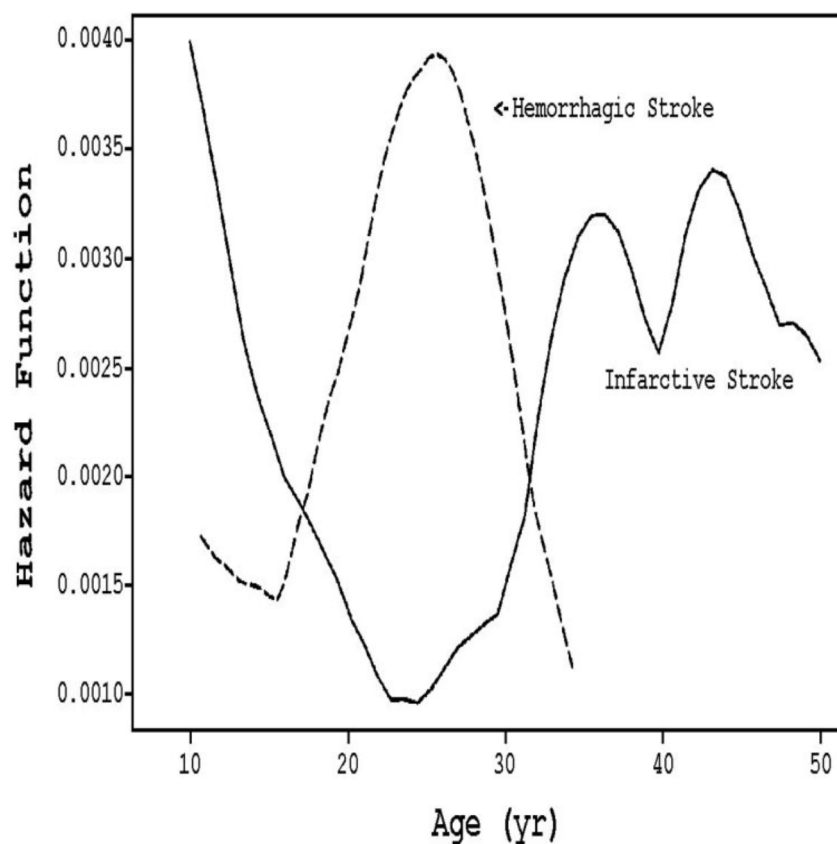


Figure 12 : Répartition des AVC chez le drépanocytaire en fonction de l'âge
D'après Ohene-Frempong, Blood 1998 (75)

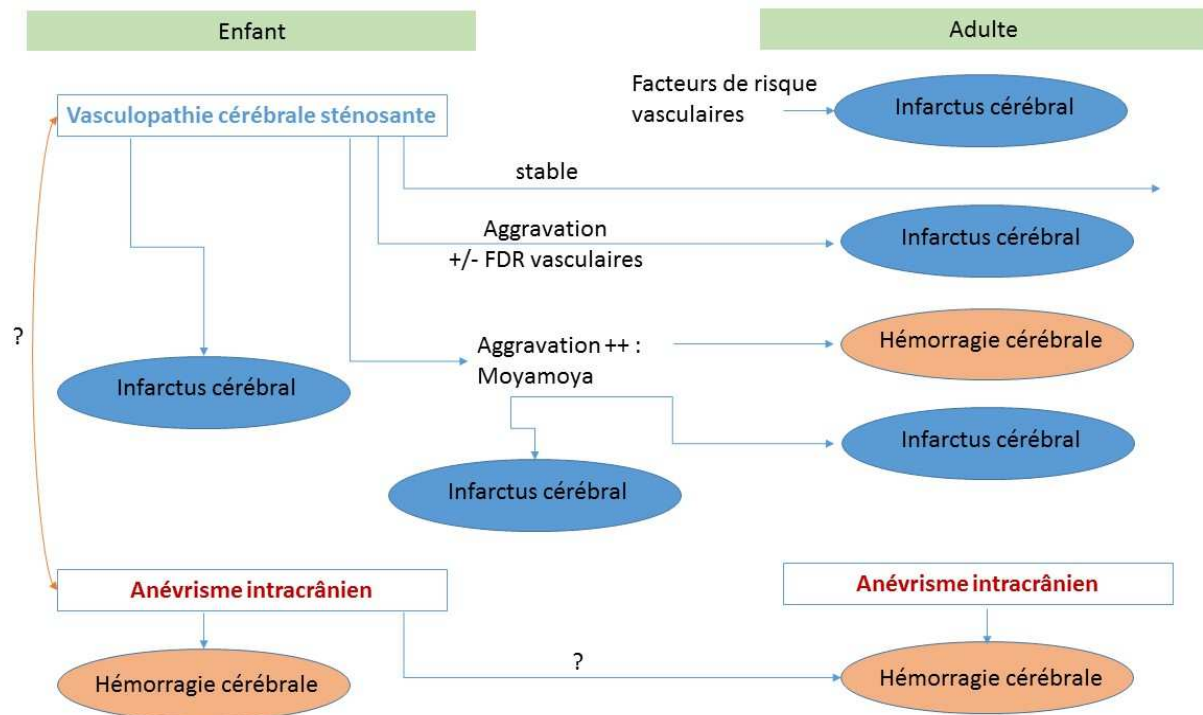


Figure 13 : Evolution des atteintes vasculaires cérébrales chez le drépanocytaire en fonction de l'âge et hypothèses physiopathologiques
FDR : facteur de risque

Les données épidémiologiques discutées ci-dessus ont été établies avant l'avènement des stratégies de prévention des infarctus cérébraux de l'enfant drépanocytaire, i.e. la mise sous programme transfusionnel des patients avec DTC anormal ou ayant présenté un infarctus cérébral. Ces stratégies sont extrêmement efficaces puisqu'en prévention secondaire elles ont permis la réduction de 90% du risque de récurrence et en prévention primaire, une réduction d'environ 80% de l'incidence des premiers infarctus cérébraux (incidence cumulée à 18 ans de 1.9% avec cette stratégie, vs 11% avant sa mise en place) (6,131).

Nous avons souhaité, à travers le travail présenté ci-après, apporter des éléments de réponse à deux types de questions restant en suspens :

- Quelle est aujourd'hui l'épidémiologie des lésions à risque hémorragique cérébral chez l'enfant drépanocytaire, à une époque où nous disposons de stratégies extrêmement efficaces pour limiter le risque ischémique cérébral et dans laquelle par conséquent l'incidence des infarctus cérébraux est très diminuée?

- Peut-on établir un rapport temporel entre l'établissement des lésions vasculaires sténosantes, le syndrome de moyamoya et les anévrismes intracrâniens chez l'enfant drépanocytaire ? Est-on plutôt dans le cadre de lésions indépendantes, d'apparition séquentielle ou concomitante ? Cela nous en apprend-il davantage sur les mécanismes physiopathologiques ?

2. Méthode

L'étude que nous avons réalisée avait donc pour objet d'évaluer le risque hémorragique cérébral dans une cohorte d'enfants drépanocytaires régulièrement suivis, notamment sur le plan de la vasculopathie sténosante, afin de pouvoir comparer l'incidence des anomalies observées des deux types. Elle a permis également de décrire une série d'anévrismes intracrâniens de l'enfant drépanocytaire et de proposer une réflexion sur leur prise en charge.

Nous avons analysé de manière rétrospective la cohorte d'enfants suivis au centre de référence des syndromes drépanocytaires majeurs de l'hôpital Necker-Enfants Malades entre 2004 et 2012. Ces enfants bénéficiaient d'un suivi standardisé et régulier, notamment un DTC annuel de l'âge de 2 ans à l'âge de 16 ans. Des critères de risque ischémique cérébral et de risque hémorragique cérébral ont permis de classer ces enfants et les lésions observées ont été décrites.

Dans cette étude, les patients considérés comme à risque ischémique cérébral (i.e. risque d'infarctus cérébral) remplissaient les critères suivants :

- Patient ayant déjà présenté un ou plusieurs infarctus cérébraux (dont le risque de récurrence a été montré comme majeur chez ces enfants)
- Et/ou patient ayant au moins 1 marqueur de vasculopathie cérébrale : DTC anormal / infarctus cérébral silencieux à l'IRM / sténose artérielle intracrânienne

Les patients considérés comme à risque hémorragique cérébral (i.e. risque d'hémorragie intracrânienne) remplissaient les critères suivants :

- Patient ayant présenté une hémorragie cérébrale non traumatique (risque important de récurrence)
- Et/ou patient avec un diagnostic d'anévrisme intracrânien ou de malformation vasculaire cérébrale

3. Résultats

Ce travail a permis de montrer les points suivants dans notre cohorte :

- Malgré la réduction globale du risque ischémique depuis les années 1990, le ratio risque hémorragique / risque ischémique est resté stable chez les enfants drépanocytaires
- Les anévrismes intracrâniens ne sont pas exceptionnels chez les enfants drépanocytaires et leurs caractéristiques sont plus proches de celles des anévrismes intracrâniens de l'adulte drépanocytaire et de celles des anévrismes intracrâniens de l'enfant en population générale
- La plupart des enfants avec anévrismes présentaient une vasculopathie sténosante associée. Le développement concomitant de lésions sténotiques et de dilatation artérielles plaide pour des facteurs physiopathologiques communs.
- La prise en charge de ces anévrismes par embolisation est possible également chez l'enfant drépanocytaire. La prise en charge au long cours sur le plan de la drépanocytose reste incertaine mais se discute une prise en charge similaire à celle de la vasculopathie sténosante

Article 4 :

Cerebral haemorrhagic risk in children with sickle cell disease.

M. Kossorotoff, V. Brousse, D. Grévent, O. Naggara, F. Brunelle, T. Blauwblomme, P. Gaussem, I. Desguerre, M. de Montalembert.

Dev Med Child Neurol. 2014 Publication avancée en ligne (doi: 10.11/dmcn.12571)

Original study, publiée.

Cerebral haemorrhagic risk in children with sickle-cell disease

MANOELLE KOSSOROTOFF¹ | VALENTINE BROUSSE² | DAVID GREVENT³ | OLIVIER NAGGARA^{3,4} | FRANCIS BRUNELLE³ | THOMAS BLAUWBLOMME⁵ | PASCALE GAUSSEM⁶ | ISABELLE DESGUERRE⁷ | MARIANE DE MONTALEMBERT²

1 Paediatric Neurology, French Centre for Paediatric Stroke, Necker-Enfants Malades University Hospital, APHP and Inserm UMR-S1140, Paris; **2** Paediatric Sickle-Cell Clinic, Necker-Enfants Malades University Hospital, APHP, Paris; **3** Paediatric Radiology and INSERM UMR1000, Necker-Enfants Malades University Hospital, APHP, Paris; **4** Neuroradiology, INSERM UMR S894, Centre Hospitalier Sainte-Anne, Paris Descartes University, Paris; **5** Paediatric Neurosurgery, INSERM UMR1000 Necker-Enfants Malades University Hospital, APHP, Paris; **6** INSERM UMR-S1140, Paris Descartes University and Hematology, Georges Pompidou European Hospital, APHP, Paris; **7** Paediatric Neurology, Paris Descartes University, Necker-Enfants Malades University Hospital, APHP, Paris, France.

Correspondence to Manoele Kossorotoff at Paediatric Neurology and French Centre for Paediatric Stroke, University Hospital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sevres, 75743 Paris Cedex 15, France. E-mail: manoele.kossorotoff@nck.aphp.fr

PUBLICATION DATA

Accepted for publication 8th July 2014.
Published online

ABBREVIATIONS

ICH	Intracranial haemorrhage
SCD	Sickle-cell disease
TCD	Transcranial Doppler

AIM To address risk of first or recurrent cerebral haemorrhage in children with sickle-cell disease (SCD) who are being managed with modern stroke prevention strategies.

METHOD A systematically followed SCD paediatric cohort was retrospectively studied over a 9-year period. Haemorrhagic risk was defined as intracranial haemorrhage occurrence or intracranial aneurysm diagnosis during the study period. Ischaemic risk was defined as cerebrovascular ischaemic event occurrence or transcranial Doppler/magnetic resonance imaging hallmarks of ischaemic risk finding during the study period.

RESULTS Among the 251 patients in the cohort, 36 patients were included in the ischaemic group. Seven patients were included in the haemorrhagic group, of which five also met the criteria for the ischaemic group. Age at first haemorrhagic symptom/hallmark of risk was older (10.4 vs 6.2 years old, $p=0.036$). Nine intracranial saccular aneurysms were found, mostly on the posterior circulation. Two patients had endovascular embolization.

INTERPRETATION The ratio of ischaemic to haemorrhagic risk was not modified with modern management compared with historical series. Intracranial aneurysm in children with SCD had specific characteristics, close to intracranial aneurysms described in adults with SCD. Data favoured concurrent development of intracranial SCD-associated anterior stenosis and posterior dilation, suggesting common pathophysiology and management strategies.

In the general paediatric population, ischaemic and primary (i.e. non-traumatic) haemorrhagic stroke are equally represented and are infrequent events, with an annual incidence of 1.2 and 1.1 per 100 000 children aged between 30 days and 20 years respectively.¹ Ischaemic stroke is mainly related with cerebral arteriopathy, mostly transient cerebral arteriopathy.² Haemorrhagic stroke is mostly caused by arteriovenous malformation; subarachnoid haemorrhage is exceptional in the paediatric population as intracranial aneurysms are rare.¹ In children with sickle-cell disease (SCD), especially those with the HbSS or HbS β^0 genotype, stroke is much more frequent with the risk of stroke estimated to be 200-fold higher than in the general paediatric population.^{3,4} Leading to severe motor and cognitive consequences, cerebrovascular complication is, therefore, a major complication in children with SCD. As ischaemic stroke accounts for three-quarters of stroke in children with SCD, most studies have addressed the risk of ischaemic stroke in these children.³ Children displaying hallmarks of stenotic vasculopathy (i.e. abnormal transcranial

Doppler [TCD]), silent infarct, or intracranial arterial stenosis have been identified as being at increased risk of a first ischaemic stroke.⁵⁻⁷ Children with SCD who experience a first stroke also have a high risk of recurrent stroke without intervention, estimated to be 50% within 2 years.⁸ In the 1990s, the implementation of systematic TCD screening and enrolment in a transfusion programme in instances of abnormal TCD or overt ischaemic stroke dramatically reduced the incidence of overt ischaemic stroke in children with SCD.^{3,8} Haemorrhagic stroke has been less extensively studied in children with SCD, probably because it is less frequent; the incidence increases with age, with the peak incidence reported in young adults aged between 20 years and 29 years.^{4,9} In young adults with SCD, the pattern of cerebrovascular complications is opposite to that of children with SCD, with haemorrhagic stroke being more frequent than ischaemic stroke.⁴ Intraparenchymal or intraventricular haemorrhage in these patients is mostly related to very severe stenotic cerebral vasculopathy leading to moyamoya syndrome. In this setting, abnormal and

fragile deep collateral vessel ruptures lead to haemorrhagic stroke. With regard to subarachnoid haemorrhage, intracranial aneurysm has been reported in about 50 adult patients with SCD. The intracranial aneurysms in these patients are different from the general population: they have a tendency to be multiple (50%), to involve the posterior circulation more frequently (33% vs 14%) and to be diagnosed at a younger age.^{10,11} In children with SCD, studies concerning haemorrhagic stroke are scarce, being mostly case reports. Among the few reported cases of intracranial haemorrhage in paediatric SCD, subarachnoid haemorrhage remains rare and a subarachnoid haemorrhage-associated intracranial aneurysm has only been reported twice. No evident link with a concurrent stenotic cerebral vasculopathy has been demonstrated to date.^{9,12–14} Management strategies have not been clearly delineated in this setting.

We conducted a retrospective study addressing cerebrovascular complications in children with SCD. As ischaemic complications have been extensively studied, we focused on haemorrhagic complications. As the risk of recurrent intracranial haemorrhage (ICH) after a first ICH is elevated, especially in children, children with SCD at risk of a first or recurrent ICH would be patients with an unruptured intracranial aneurysm or cerebrovascular malformation and patients who had experienced a first intracranial haemorrhage.¹⁵ The aim of this study was to report the characteristics of intracranial aneurysm or primary intracranial haemorrhage in a cohort of children with SCD and their relationship with the classic stenotic cerebral vasculopathy, in order to refine the description and give insights into the pathophysiological mechanisms and the treatment strategies.

METHOD

Population

A retrospective single-centre study was conducted in the paediatric sickle-cell clinic of the University Hospital Necker-Enfants Malades in Paris, France. Paediatric patients with the HbSS or HbS β^0 SCD genotype aged between 1 month and 18 years recorded in the sickle-cell clinic patient database during the period 2004 to 2012 were eligible. All patients were systematically assessed and followed. In particular, they had annual TCD screening from 2 years of age until 16 years, and subsequent management according to international guidelines.

Patients were considered at risk of a first or recurrent cerebrovascular ischaemic event ('ischaemic group') if they were reported in the database with: (1) one or more overt ischaemic stroke; and/or (2) hallmarks of cerebrovascular ischaemic risk during the study period. Hallmarks of ischaemic risk in this study were the following: abnormal TCD screening (TAMMV ≥ 200 cm/s according to international guidelines), or silent cerebral infarct on brain magnetic resonance imaging (MRI >3 mm white matter T2 or fluid attenuated inversion recovery

What this paper adds

- Despite reduction in ischaemic stroke, the ratio of ischaemic to haemorrhagic cerebrovascular risk in paediatric SCD remains stable.
- Intracranial aneurysm is not exceptional in children with SCD, and bears specific characteristics.
- Concurrent development of arterial stenosis and dilation is supported by this study, with a possible common pathophysiology.
- This is a first report of intracranial aneurysm endovascular coil embolization in paediatric SCD.

[FLAIR] hypersignal without reported clinical acute symptom), or intracranial stenosis on brain magnetic resonance angiography (MRA). Patients were considered at risk of a first or recurrent cerebrovascular haemorrhagic event ('haemorrhagic group') if they were reported in the database with: (1) a primary intracranial haemorrhage; and/or (2) a radiological diagnosis of intracranial aneurysm or vascular malformation during the study period. Patients fulfilling the inclusion criteria for both groups were also noted.

Clinical data such as sex, age, and circumstances of cerebrovascular complication diagnosis were recorded. Personal history of SCD was noted. All patients included in the ischaemic group and in the haemorrhagic group had at least one brain MRI with MRA during the study period. Brain and intracranial vascular imaging data of patients included in both groups were reviewed by a paediatric neuroradiologist (DG). The type, number, and localization of arterial lesions (stenosis, occlusion, moyamoya, and aneurysm) were recorded from MRA and/or digitally subtracted angiography images. The type, number, and localization of parenchymal ischaemic lesions (silent cerebral infarct, cortical or subcortical infarct) were recorded from T2, FLAIR, and T1 brain magnetic resonance images. A history of abnormal TCD screening and category of the closest TCD screening to cerebrovascular complication diagnosis were also collected. Management and follow-up data were collected.

Statistical methods

Comparison of mean age at first ischaemic and haemorrhagic symptom was addressed using the Mann-Whitney *U* nonparametric test, because of the small sample size.

RESULTS

During the study period, 251 non-neonate paediatric patients with the HbSS or HbS β^0 SCD phenotype were recorded in the local database. Thirty-eight patients (15.1%) met the criteria for inclusion in the ischaemic group. However, two patients had insufficient available data and were excluded from the study group, leaving 36 patients in the ischaemic group. Seven patients (2.8%) met the criteria for inclusion in the haemorrhagic group, among which the majority (five out of seven) also met the criteria for the inclusion in the ischaemic group. They were therefore included in both groups. The results are reported in Table I.

Ischaemic group

Thirty-six patients were included in the final study group: 15 males and 21 females, sex ratio 0.71, with a mean age of 6.2 years, ± 3.4 years, range 1.6–13.8 (descriptive analysis excluding patients belonging to both groups gives non-significantly different results, data not shown). The first cerebrovascular symptom/hallmark was stroke or transient ischaemic attack in nine patients, abnormal TCD with silent infarct in eight patients, and abnormal TCD without overt or silent infarct in 18 patients. One patient with normal TCD had minor silent infarcts discovered on a brain MRI for primary subarachnoid haemorrhage. Arterial stenotic/occlusive lesions were mainly located on the anterior circulation, affecting predominantly the middle cerebral artery, the internal carotid artery, and the anterior cerebral artery. Brain infarctive lesions were mainly located in the middle cerebral artery and watershed territories. Thirty-four patients started or continued a monthly transfusion programme. One patient developed allo-immunization contraindicating further transfusions and was treated with hydroxycarbamide only. One patient had a cardioembolic stroke and was not considered eligible for a transfusion programme.

During follow-up, five out of 36 patients developed moyamoya syndrome, of which three patients underwent surgical revascularization, one patient was not retained for surgical indication, and at the time of writing, one patient was still undergoing presurgical evaluation.

Haemorrhagic group

Seven patients were included in this group: three males and four females, sex ratio 0.75. The mean age at first haemorrhagic symptom/hallmark was 10.5 years ($p=0.036$ when compared to age at first ischaemic symptom/hallmark, Mann–Whitney U test). In this group, when considering both haemorrhagic and ischaemic cerebrovascular symptoms, the mean age at first symptom/hallmark was 8.9 years old. Four patients (out of seven) presented with symptomatic ICH (i.e. two patients with subarachnoid haemorrhage, one patient with intraventricular haemorrhage, and one patient with intraparenchymal haemorrhage and ventricular extension). Intracranial aneurysm was demonstrated in five children (three males, two females). Two had symptomatic ICH and three had a diagnosis of asymptomatic unruptured intracranial aneurysm on a brain MRI prompted by abnormal TCD or previous infarctive stroke.

One patient had multiple intracranial aneurysms with five different locations, and four out of five patients had a single intracranial aneurysm. Most of the intracranial aneurysms (six out of nine) were located on the posterior circulation: the posterior cerebral artery ($n=5$) or the basilar artery ($n=1$). Only three out of nine intracranial aneurysms were located on the anterior circulation: the intracranial carotid artery ($n=2$) or the ophthalmic artery ($n=1$). No intracranial aneurysm was observed on the anterior communicating artery or on the middle cerebral artery bifurcation (M2 segment). They had a saccular or nipple shape in eight of the patients; one patient presented with a

fusiform aneurysm of the internal carotid artery. No giant aneurysm was observed.

TCD and/or brain MRA-MRI suggested concurrent SCD-associated stenotic cerebral vasculopathy in five out of seven patients, with mild (conditional TCD $n=1$; white matter T2 hypersignals $n=2$) or severe hallmarks (abnormal TCD $n=2$; intracranial stenosis $n=1$; previous arterial ischaemic stroke $n=2$; moyamoya syndrome $n=2$) (Fig. 1).

Intracranial aneurysm management and subsequent haematological treatment modifications varied according to the individual patients. Patient 1 had multiple symptomatic intracranial aneurysms and underwent endovascular coil embolization for two out of five intracranial aneurysms, resulting in complete intracranial aneurysm occlusion. The other three intracranial aneurysms were small and no treatment was offered but they were followed up closely. After 2-years follow-up, these intracranial aneurysms remained stable (Fig. 2). The four patients bearing a small single aneurysm initially had neither endovascular nor surgical treatment for their intracranial aneurysm, but close imaging follow-up: two had spontaneous thrombotic intracranial aneurysm occlusion, one remained stable, one enlarged and underwent further endovascular embolization (patient 3).

Treatment aimed at reducing further vascular risk related to SCD was initiated or maintained in nearly all patients, with or without intracranial aneurysm: two patients started hydroxycarbamide treatment, whereas four started or continued a monthly transfusion programme.

The personal history of SCD complications showed no difference between the ischaemic and haemorrhagic groups.

DISCUSSION

This is the first study that addresses the risk of cerebrovascular haemorrhage in children with SCD since the introduction and the wide use of ischaemic stroke prevention strategies. It gives insights into relationships between cerebrovascular haemorrhagic risk and the ischaemic vasculopathy, delineates characteristics of intracranial aneurysm, and suggests management strategies for patients with SCD with intracranial aneurysm.

Since the Stroke Prevention Trial in Sickle-cell Anaemia studies and the introduction of TCD screening leading to widespread primary prevention strategies, the incidence of ischaemic stroke in high-income countries has decreased dramatically in the paediatric SCD population, dropping by nearly 90%.³ Descriptions of patients using the modern management strategies are now available for ischaemic stroke and TCD abnormalities; however, the studies of children with SCD with haemorrhagic risk or stroke were all published before widespread use of TCD.^{3,9} The inclusion period in our study started after the introduction of systematical TCD use in our centre, and this series is the first to address haemorrhagic risk and stroke in children with SCD undergoing modern management protocols. In our study, the estimated rate per person years exposure for ischaemic risk was 2.5 per 100 person years (95% confidence interval [CI] 1.8–3.4, exact mid- p test), which is

Table 1: Patients with sickle-cell disease at risk of cerebrovascular haemorrhage: patient descriptions

Patient	Sex	Age at first haemorrhagic risk hallmark/ age at first ischaemic risk hallmark (y)	Localization and number of ICA(s)	MRI indication	TCD category	Parenchymal lesions (brain MRI)	Arterial lesions (brain MRA)	Intracranial aneurysm initial management	Follow-up, second-line treatment
1	Male	11/–	PCA (3), BA (1), ophthalmic artery (1)	SAH, mild chronic cognitive impairment	Normal	Watershed zones hypersignals <3mm	None	Endovascular: coiling ($n=2$), close follow-up ($n=3$)	Coiled intracranial aneurysms: occlusion, intracranial aneurysm stability 3/5
2	Female	5/5	PCA (3)	Abnormal TCD	Abnormal	Thalamic infarction, watershed zones hypersignals <3mm	None	Close follow-up	Intracranial aneurysm spontaneous thrombosis
3	Female	12/–	PCA (1)	Endocarditis, conditional TCD	Conditional	None	None	Close follow-up	Intracranial aneurysm enlargement, endovascular coiling
4	Male	12/7	Internal carotid artery (1)	History of infarctive stroke, mild cognitive impairment	Incomplete	Ancient stroke (left)	Moyamoya syndrome (left)	Close follow-up	Intracranial aneurysm stability
5	Male	13/13	Internal carotid artery (1)	SAH during acute chest syndrome	Normal	None	None	Close follow-up	Intracranial aneurysm spontaneous thrombosis
6	Female	10/10	None	IPH	Abnormal	Frontal IPH, IVH, watershed zones silent infarcts, ancient cortical stroke	Severe internal carotid artery stenosis (left)	NA	NA
7	Female	13/4	None	IVH	Abnormal	IVH, multiple ancient strokes	Moyamoya syndrome (bilateral)	NA	NA

BA, basilar artery; MRA, magnetic resonance angiography; MRI, magnetic resonance imaging; IPH, intraparenchymal cerebral haemorrhage; IVH, intraventricular haemorrhage; PCA, posterior cerebral artery; SAH, subarachnoid haemorrhage; TCD, transcranial Doppler; NA, not applicable.

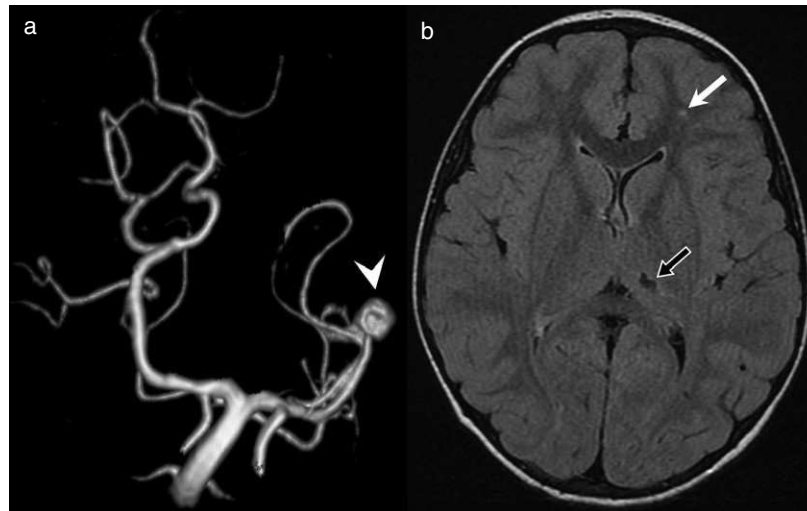


Figure 1: Concurrent intracranial aneurysm and brain ischaemic lesions in patient 2. (a) Three-dimensional time-of-flight magnetic resonance angiography. Arrow head: 6mm saccular single aneurysm on the distal part of the left posterior cerebral artery, without arterial stenosis. (b) concurrent brain magnetic resonance imaging, fluid attenuated inverted recovery sequence. Black arrow, thalamic infarctive stroke (ancient); white arrow, white matter hypersignal <3mm in anterior watershed region.

similar to published data in the literature.³ The estimated rate per person years exposure for haemorrhagic risk in the same population is seven times lower: 0.33 per 100 person years (CI 0.12–0.73, exact mid-*p* test). Based on the high prevalence of ischaemic stroke in children and haemorrhagic stroke in young adults, the mechanisms of intracranial artery stenosis and dilation have usually been thought to be independent or sequential, with haemodynamic changes caused by arterial occlusions in childhood possibly leading to aneurysm formation in adolescence or adulthood.^{16,17} In our series, several findings dispute this theory. First, half of our patients with intracranial aneurysm or haemorrhagic stroke did not have severe intracranial vaso-occlusive disease. Second, the ratio between ischaemic

and haemorrhagic risk in paediatric patients with SCD remains quite similar to historical series in this population, with modern management aiming at reducing brain ischaemic risk: 75% of ischaemic stroke before TCD use,⁴ 85% of ischaemic stroke risk in our series. Third, five out of seven patients meeting the criteria for inclusion in the haemorrhagic group also met criteria for inclusion in the ischaemic group, with abnormal TCD, silent or overt infarct, or moyamoya syndrome. They were, therefore, considered to have concurrent stenotic cerebral vasculopathy. Furthermore, in the literature several common risk factors were identified for both ischaemic and haemorrhagic stroke in SCD: low steady-state haemoglobin concentration, high steady-state leukocyte count, acute chest

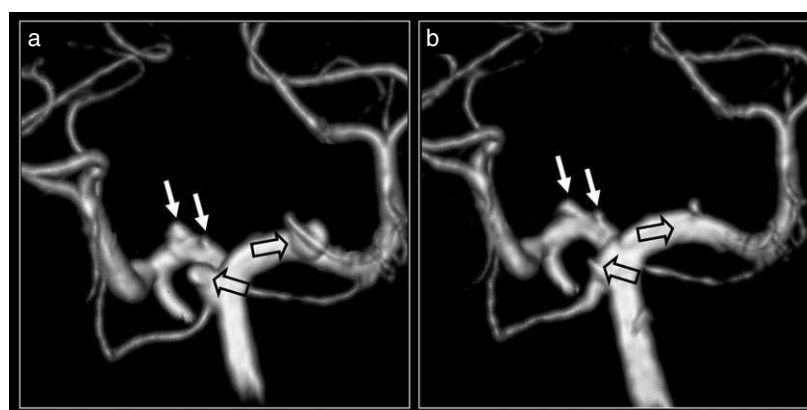


Figure 2: Magnetic resonance angiography (MRA) in patient 1 before and after aneurysm embolization (posterior view). (a) Three-dimensional time-of-flight MRA at diagnosis. Black arrows: large basilar artery and right posterior cerebral artery aneurysms. White arrows: small left posterior cerebral artery aneurysms. (b) Three-dimensional time-of-flight MRA 3 months after endovascular embolization of the two largest aneurysms (black arrows).

syndrome, acute hypertension and hypertransfusion, but also previous ischaemic stroke and moyamoya.⁹ Finally, common histopathological findings have been described in both aneurysms and cerebrovascular occlusive lesions in SCD: intimal hyperplasia, smooth-muscle layer hyalinization, and elastic lamina fragmentation.^{12,18} Observing concurrent intracranial aneurysm and cerebral vasculopathy in our patients suggests a possible concurrent development of stenosis and dilation, and possible common pathophysiological mechanisms, as proposed by Oyesiku et al.¹⁸ They hypothesized that recurrent erythrocyte sickling and subsequent mechanical injury, with endothelial lesions and arterial wall fragmentation and degeneration, could be the initial injury. It could consequently lead to either excessive scarring (stenosis) or wall fragmentation (dilation).¹⁸ The pathway orientation might depend on local rheological or tissue characteristics, explaining the different localization of lesions, with predominant stenotic lesions in the anterior circulation and intracranial aneurysm in the posterior circulation.

Despite the small number of patients, characteristics of the nine intracranial aneurysms found in our paediatric series are interesting to compare with intracranial aneurysms in the general or SCD population to delineate specificities. The intracranial aneurysm characteristics in our paediatric patients with SCD are quite different from those in the general paediatric population. In terms of incidence, intracranial aneurysm accounts for only 10% to 15% of non-traumatic haemorrhagic strokes in individuals younger than 20 years of age.¹⁹ In our population, an opposite pattern was observed as no arteriovenous malformation and no cavernoma was found. From published data, we calculated an estimated rate per person years exposure of ICH related to intracranial aneurysm in the general paediatric population of 0.11 to 0.165 per 100 000 person years.^{1,19} In our population of 251 paediatric patients with SCD, the estimated rate per person years exposure was 330 per 100 000 person years. Thus, intracranial aneurysms seem much more frequent in our patients with SCD than in the general paediatric population, even if there may be an overestimation as we also recorded unruptured aneurysm. As brain MRI is not systematically recommended in paediatric patients with SCD in our country, MRI was always prompted by clinical or TCD abnormalities in our sample. We might thus even underestimate the real intracranial aneurysm incidence in children with SCD. We focused on paediatric patients because the highest incidence of neurovascular injury is reported at this age and because it allows an early assessment in a supposedly sequential natural history. Prospective longitudinal studies of patients with SCD from childhood to adulthood would be necessary to assess the evolution and time sequence of cerebrovascular lesions in the long term. In particular, it would help to identify novel risk factors in adulthood, unrelated to SCD and risk factors ongoing from childhood.

In terms of lesion shape and location, in the general paediatric population fusiform aneurysms are observed in the vertebrobasilar system, whereas saccular aneurysms are

present mostly in the anterior circulation.²⁰ The opposite pattern was observed in our patients, with eight out of nine saccular intracranial aneurysms mostly located on the posterior circulation and one fusiform intracranial aneurysm located on the internal carotid artery. Some classic sites of intracranial aneurysm development, such as the anterior communicating cerebral artery or middle cerebral artery bifurcation, were not represented in our sample. Two intracranial aneurysms were found on the internal carotid artery termination. On the contrary, posterior locations were more frequent in our patients than in the general paediatric population. It has been reported that posterior circulation intracranial aneurysm represented 27% of paediatric intracranial aneurysm locations.²⁰ In our series, six out of nine (67%) intracranial aneurysms were located on the posterior circulation. Considering pathophysiology, these intracranial aneurysm development shapes and sites are striking because they correspond neither to classic haemodynamic-sensitive locations nor to the classic anterior territories involved in the stenotic vasculopathy. A systemic vascular wall weakness related to SCD is not likely because extracranial aneurysm is infrequent in patients with SCD. Regional rheological or histoanatomical particularities may be suspected and further studies are encouraged to understand and confirm these features. Finally, the intracranial aneurysm characteristics of our paediatric patients with SCD (possibility of multiple lesions, predominance on the posterior circulation) were closer to intracranial aneurysm characteristics in adult patients with SCD than in the general paediatric population.

The specific characteristics of intracranial aneurysms in patients with SCD and the underlying condition itself suggest individual tailored treatment strategies. Intracranial aneurysm is usually treated by either surgical craniotomy and clipping of the aneurysm neck or an intravascular procedure to obliterate the aneurysm via selective coil embolization or intracranial stenting. The strategy option is guided by clinical and radiological characteristics of the aneurysm. Patients with SCD who have a hypercoagulable status bear an additional risk of an acute postprocedure severe vaso-occlusive event in both strategies. Furthermore, sickling and thrombus formation may be increased by general anaesthesia in the case of hypoxia, hypovolemia, acidosis, or hypothermia. Both treatment strategies also have specific risks related to SCD. Some hyperosmolar radiologic contrast media used in endovascular procedures may be considered as a potential sickling risk factor.²¹ Catheterizing vessels with probably abnormal walls also bears a risk of artery dissection, vascular occlusion, and/or aneurysm perforation. On the other hand, surgery may be at risk in SCD because of increased skull vascularity, especially in moyamoya syndrome. In both treatment options, careful management of hydration status, total haemoglobin, and haemoglobin S levels is recommended.^{22–24} Patients 1 and 3 are the first reported successful coil embolization procedures in paediatric patients with SCD. In patients 2 and 5, because of aneurysm characteristics such as distal location

and large neck, the only treatment that could have been offered would have been parent vessel occlusion with a stenting device, which is associated with a higher risk of downstream ischaemic stroke. Therefore, no treatment was offered and close follow-up was decided. The unusual evolution towards spontaneous thrombosis of these large neck aneurysms highlights the hypercoagulable status in patients with SCD and the possibility of spontaneous aneurysm exclusion, which is infrequent in classic paediatric intracranial aneurysm.²⁰

Besides aneurysm treatment itself, long-term medical management in the setting of SCD has not been addressed. As a common pathophysiology for intracranial stenosis and dilation formation, or at least common risk factors related to SCD disease severity, is hypothesized, the potential benefits of strategies initially defined for stenotic SCD-related vasculopathy may be discussed in this setting (i.e. exchange transfusion programme and/or hydroxycarbamide treatment). Our patients with concurrent stenotic vasculopathy were started on monthly transfusion programmes or hydroxycarbamide treatment, but management of haemorrhagic patients without evidence of stenotic vasculopathy remains speculative. Further studies addressing intracranial aneurysm evolution and haemorrhagic event recurrence are encouraged to evaluate management strategies in the long term. Because of the relatively low incidence, multicentre studies with common protocols

would allow researchers to gather larger patient cohort groups and information to study these relatively uncommon but potentially catastrophic events.

Despite the use of strategies aimed at ischaemic stroke prevention, the ratio between cerebral ischaemic and haemorrhagic risk remained stable in this study. Furthermore, children with SCD at risk of cerebral haemorrhage also had a concurrent ischaemic risk. These findings support the hypothesis of a common pathophysiological mechanism and the possible concurrent development of stenotic lesions and aneurysm pouch. Intracranial aneurysm in these patients has specific characteristics, more similar to intracranial aneurysm in adult patients with SCD than with intracranial aneurysms in the general paediatric population. Management of intracranial aneurysms in the setting of paediatric SCD requires benefit/risk analysis and further studies are encouraged to improve our understanding of pathophysiological features, in order to rationalize long-term management strategies for those patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dr Manoelle Kossorotoff received a research grant 'Poste d'accueil Inserm' funded by the French Institut National pour la Recherche Médicale to support her work concerning cerebrovascular complication in sickle-cell disease children. The authors have stated that they had no interests that might be perceived as posing a conflict or bias.

REFERENCES

- Fullerton HJ, Wu YW, Zhao S, Johnston SC. Risk of stroke in children. Ethnic and gender disparities. *Neurology* 2003; **61**: 189–94.
- Ganesan V, Prengler M, McShane MA, Wade AM, Kirkham FJ. Investigation of risk factors in children with arterial ischaemic stroke. *Ann Neurol* 2003; **53**: 167–73.
- Bernaudo F, Verlhac S, Arnaud C, et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood* 2011; **117**: 1130–40.
- Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood* 1998; **91**: 288–94.
- Adams RJ, McKie VC, Brambilla D, et al. Stroke prevention trial in sickle cell anemia. *Control Clin Trials* 1998; **19**: 110–29.
- Miller ST, Macklin EA, Pegelow CH, et al. Silent infarction as a risk factor for overt stroke in children with sickle cell anemia: a report from the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *J Pediatr* 2001; **139**: 385–90.
- Abboud MR, Cure J, Granger S, et al. Magnetic resonance angiography in children with sickle cell disease and abnormal transcranial Doppler ultrasonography findings enrolled in the STOP study. *Blood* 2004; **103**: 2822–6.
- Pegelow CH, Adams RJ, McKie V, et al. Risk of recurrent stroke in patients with sickle cell disease treated with erythrocyte transfusions. *J Pediatr* 1995; **126**: 896–9.
- Strouse JJ, Hulbert ML, DeBaun MR, Jordan LC, Casella JF. Primary hemorrhagic stroke in children with sickle cell disease is associated with recent transfusion and use of corticosteroids. *Pediatrics* 2006; **118**: 1916–24.
- Brandao RA, de Carvalho GT, Reis BL, Bahia E, de Souza AA. Intracranial aneurysms in sickle cell patients: report of 2 cases and review of the literature. *Surg Neurol* 2009; **72**: 296–9.
- Preul MC, Cendes F, Just N, Mohr G. Intracranial aneurysms and sickle cell anemia: multiplicity and propensity for the vertebrobasilar territory. *Neurosurgery* 1998; **42**: 971–7.
- Anson JA, Koshy M, Ferguson L, Crowell RM. Subarachnoid haemorrhage in sickle-cell disease. *J Neurosurg* 1991; **75**: 552–8.
- Carey J, Numaguchi Y, Nadell J. Subarachnoid haemorrhage in sickle-cell disease. *Childs Nerv Syst* 1990; **6**: 47–50.
- Van Hoff J, Ritchey AK, Shaywitz BA. Intracranial haemorrhage in children with sickle cell disease. *Am J Dis Child* 1985; **139**: 1120–3.
- Fullerton HJ, Wu YW, Sidney S, Johnston SC. Recurrent hemorrhagic stroke in children: a population-based cohort study. *Stroke* 2007; **38**: 2658–62.
- Batjer HH, Adamson TE, Bowman GW. Sickle-cell disease and aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Surg Neurol* 1991; **36**: 145–9.
- Diggs LW, Brookoff D. Multiple cerebral aneurysms in patients with sickle-cell disease. *South Med J* 1993; **86**: 377–9.
- Oyesiku NM, Barrow DL, Eckman JR, Tindall SC, Colohan AR. Intracranial aneurysms in sickle-cell anemia: clinical features and pathogenesis. *J Neurosurg* 1991; **75**: 356–63.
- Gemmete JJ, Toma AK, Davagnanam I, Robertson F, Brew S. Pediatric cerebral aneurysm. *Neuroimaging Clin N Am* 2013; **23**: 771–9.
- Lasjaunias P, Wuppallapati S, Alvarez H, Rodesch G, Ozanne A. Intracranial aneurysms in children aged under 15 years: review of 59 consecutive children with 75 aneurysms. *Childs Nerv Syst* 2005; **21**: 437–50.
- McQuaker IG, Jaspan T, McConachie NS, Dolan G. Coil embolization of cerebral aneurysms in patients with sickling disorders. *Br J Haematol* 1999; **106**: 388–90.
- Ediriwickrema A, Williamson T, Hebert R, Matouk C, Johnson MH, Bulsara KR. Intracranial stenting as monotherapy in subarachnoid haemorrhage and sickle cell disease. *J Neurointerv Surg* 2013; **5**: e4.
- Vicari P, Chaoiray AC, Siufi GC, Arantes AM, Fonseca JR, Figueiredo MS. Embolization of intracranial aneurysms and sickle-cell disease. *Am J Hematol* 2004; **76**: 83–4.
- Firth PG, Peterfreund RA. Management of multiple intracranial aneurysms: neuroanesthetic considerations of sickle-cell disease. *J Neurosurg Anesthesiol* 2000; **12**: 366–71.

4. Discussion, perspectives

Caractéristiques des anévrismes intracrâniens de l'enfant drépanocytaire

Cette étude a permis d'observer dans le cadre d'une cohorte régulièrement suivie l'incidence de découverte d'anévrismes intracrâniens ou d'hémorragie cérébrale. Elle a montré que ces anévrismes intracrâniens de l'enfant drépanocytaire sont plus proches de ceux de l'adulte drépanocytaire que ceux de la population pédiatrique générale : possibilité d'anévrismes multiples, prédominance sur la circulation postérieure. Cela suggère donc une physiopathologie, des facteurs de risque et une localisation différents de ceux de la population pédiatrique tout venant. Leur prise en charge est à remettre dans le contexte de la maladie générale drépanocytaire avec ses risques de complications lors de déséquilibres hémodynamiques, d'anémie aiguë surajoutée à une anémie chronique, d'une anesthésie ou de toute autre agression et sera discutée dans le paragraphe « propositions de stratégies de prise en charge ».

Mécanismes physiopathologiques des lésions hémorragiques et ischémiques cérébrales

L'observation concomitante dans notre cohorte de lésions « ischémiques » et « hémorragiques », dès l'enfance, plaide pour l'hypothèse de mécanismes physiopathologiques communs. Les mécanismes d'agression de la paroi vasculaire ont été détaillés dans les travaux présentés précédemment. La réaction différente de la paroi, soit avec un épaississement, soit avec une dilatation, pourrait expliquer les deux types de lésions observés.

Cette concomitance de lésions vaso-occlusives et d'anévrismes avait été retrouvée dans une série rétrospective de 10 patients drépanocytaires homozygotes (regroupant des adultes et des enfants) qui avaient présenté une « complication neurovasculaire nécessitant une intervention neurochirurgicale ». Chez 9 patients sur les 10, étaient retrouvées des lésions vaso-occlusives sévères de la circulation antérieure (carotide interne et artère cérébrale moyenne) concomitantes, déjà connues et s'étant manifestées par un ou plusieurs infarctus symptomatique pour la majorité (163). Cependant, les outils de prédiction ou de dépistage de la vasculopathie sténosante ne sont pas adaptés pour détecter ces anévrismes. En effet, le doppler transcrânien n'est

pas un bon outil pour faire le diagnostic d'anévrisme, d'autant que les anévrismes que nous avons observés étaient fréquemment de petite taille et postérieurs. La prédiction des hémorragies cérébrales par le DTC est moins bonne que celle des infarctus, même si cette prédictivité s'améliore un peu en utilisant la vitesse comme une variable continue (10).

Sur le plan physiopathologique, le mécanisme de formation des anévrismes intracrâniens qui est proposé est celui d'une agression endothéliale chronique par les érythrocytes drépanocytaires et l'occlusion de vasa vasorum par les érythrocytes falciformés, entraînant un affaiblissement de la paroi artérielle. La constitution des anévrismes serait ainsi favorisée par cette fragilité de la paroi associée aux modifications hémodynamiques de la drépanocytose, notamment l'hyperdébit permanent lié à l'anémie chronique (164). Une accentuation du débit dans la circulation postérieure du fait de sténoses/occlusions artérielles de la circulation antérieure (lieu privilégié des lésions sténotiques dans la drépanocytose) pourrait également expliquer la propension particulière à la constitution d'anévrismes postérieurs chez ces patients.

La constatation de similitudes histologiques importantes entre ces différents types de lésions est un argument supplémentaire pour une voie de constitution en grande partie commune : épaissement intimal, hyalinisation et amincissement de la couche de cellules musculaires lisses, épaissement mais également fragmentation de la limitante élastique interne (figures 14 et 15).

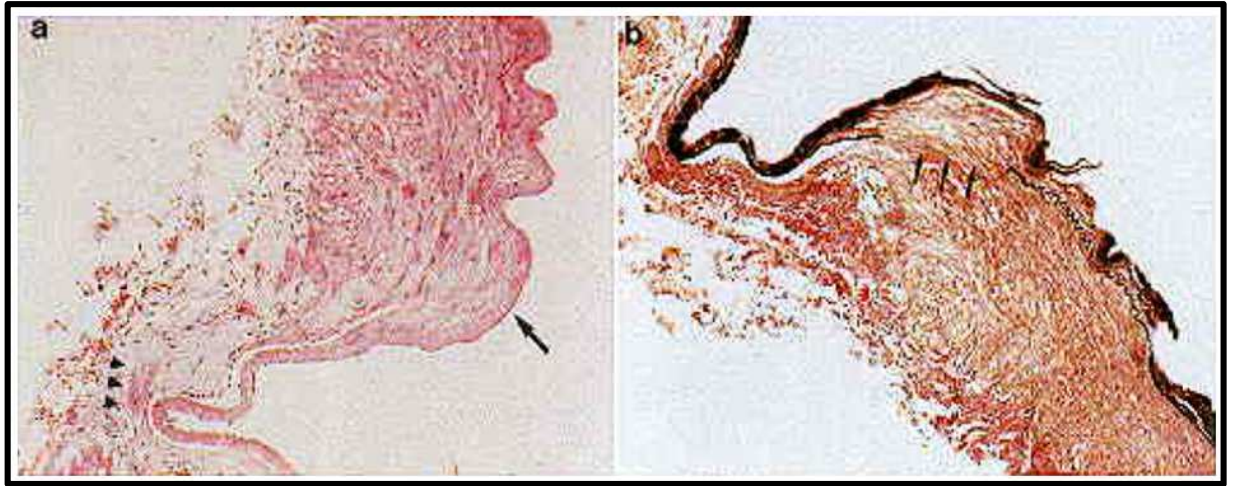


Figure 14 : Coupes anatomiques de lésions anévrismales de patient drépanocytaire
 a. Hyalinisation de la couche de cellules musculaires lisses (flèche), qui est atrophique et amincie au niveau de l'anévrisme (pointes de flèche). Epaississement de l'intima.
 b. Duplication, épaississement et atténuation de la limitante élastique. Interruption par endroits de la limitante élastique interne (flèches).

Tiré de Oyesiku J Neurosurg 1991 (164)



Figure 15 : Vasculopathie cérébrale drépanocytaire sténosante : coupe histologique d'une grosse artère cérébrale
 On observe la prolifération intimale, les modifications de la limitante élastique et l'hyperplasie des cellules musculaires lisses.

Tiré de Pegelow, Arch Neurol 2001 (14)

Oyesiku a proposé en 1991 un schéma physiopathologique reprenant ces hypothèses (figure 16) et les données obtenues dans notre étude sont compatibles avec cette proposition.

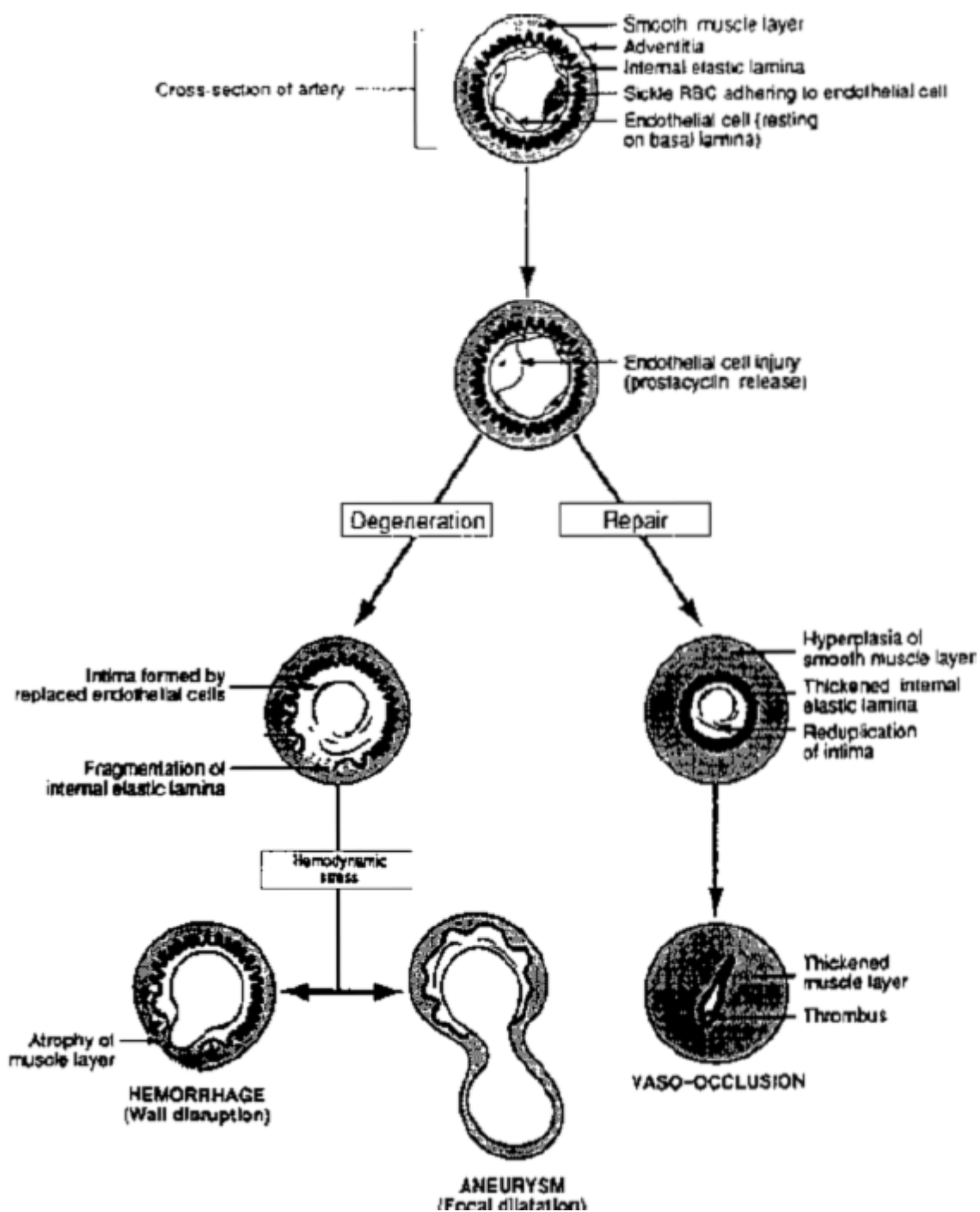


Figure 16 : Mécanisme de constitution des lésions sténosantes et des dilatations artérielles dans la drépanocytose

Tiré de Oyesiku J Neurosurg 1991 (164)

Ces différents résultats incitent à considérer le risque hémorragique et les lésions artérielles correspondantes comme une autre facette de la vasculopathie cérébrale drépanocytaire. Se discute donc d'envisager des stratégies de prise en charge communes au long cours.

Propositions de stratégies de prise en charge

Un résultat important de notre étude est l'observation d'un ratio entre lésions à risque ischémique et lésions à risque hémorragique qui reste stable dans le temps malgré l'utilisation de stratégies visant à réduire ou limiter l'évolution des lésions à risque ischémique. Cela signifie donc que l'incidence des lésions hémorragiques a probablement elle aussi diminué. On peut imaginer soit un meilleur contrôle des facteurs de risque (mais l'hypertension artérielle est très rare chez les enfants drépanocytaires), soit une efficacité des programmes d'échanges transfusionnels sur l'apparition de ces lésions à risque hémorragique. Cette dernière hypothèse est renforcée par l'observation dans cette étude d'un âge plus tardif d'apparition du risque hémorragique par rapport au risque ischémique. Les transfusions régulières dès l'apparition du risque ischémique pourraient ainsi diminuer la probabilité d'apparition du risque hémorragique. Cette donnée est importante car, s'il existe des recommandations de dépistage et de prise en charge de la vasculopathie sténosante, il n'y a pas actuellement de stratégie thérapeutique au long cours définie devant une hémorragie cérébrale ou la découverte d'un anévrisme intracrânien chez un drépanocytaire. La mise sous hydroxycarbamide ou l'inclusion dans un programme d'échanges transfusionnels sont régulièrement discutées dans ces circonstances de lésions hémorragiques, mais sans élément formel de choix. Nos données et la réflexion sur la physiopathologie commune suggèrent l'utilisation des stratégies ayant fait leurs preuves dans la vasculopathie sténosante pour la prise en charge au long cours des enfants avec hémorragie cérébrale et/ou anévrisme intracrânien.

Pour la prise en charge de l'hémorragie cérébrale à la phase aiguë, un échange transfusionnel en urgence est souvent proposé. Son but ne serait pas tant de jouer sur l'hémorragie elle-même, mais plutôt de préparer la procédure d'artériographie qui sera réalisée en urgence à la recherche d'une lésion vasculaire curable. En effet, notre article rapporte pour la première fois la prise en charge en radiologie interventionnelle d'un anévrisme intracrânien chez un enfant drépanocytaire. Certains patients de cette série ont également eu une thrombose spontanée de l'anévrisme, dans le contexte

d'hypercoagulabilité de la drépanocytose, largement évoqué dans les parties précédentes de ce travail. L'analyse des cas de notre série ouvre la perspective à des stratégies de prise en charge de l'anévrisme lui-même un peu différentes de ce qui a pu être discuté dans d'autres cas rapportés : la possibilité de surseoir au traitement invasif et surveiller si cet anévrisme se thrombose spontanément mais aussi la possibilité de réaliser un traitement endovasculaire d'oblitération de la poche anévrismale même s'il existe des lésions artérielles sténosantes (mais qui ne concernent pas les mêmes artères).

C. Conclusions générales, perspectives de recherche ultérieures

Les travaux réalisés pour cette thèse ont permis de répondre à des questions spécifiques posées par la vasculopathie cérébrale de l'enfant drépanocytaire et ouvrent sur des perspectives de recherche complémentaires.

En premier lieu, nous avons montré l'intérêt de la quantification des cellules souches hématopoïétiques CD34+ dans la prédiction des événements vasculaires dans une cohorte de 108 enfants drépanocytaires. Il s'agit d'un marqueur dont le dosage est accessible aux laboratoires munis de cytomètres en flux, et dont la quantification est standardisée et à terme accréditable, donc permettant de réaliser des études multicentriques. En effet la numération des CD34+ a été développée pour le contrôle de qualité des greffons de moelle et bénéficie de recommandations européennes pour uniformiser son dosage (ISHAGE). Cette étude a permis de montrer que le nombre de CD34+ est prédictif à la fois sur les événements neurovasculaires mais aussi périphériques, soulignant le fait que si les complications peuvent être de nature différente selon les organes (atteinte des petits vs gros vaisseaux, phénomènes d'hémolyse vs occlusion) il n'en reste pas moins que la drépanocytose est une maladie générale et que des facteurs communs peuvent être mis en évidence. Bien sûr, ce résultat nécessite d'être confirmé sur une étude prospective, qui pourrait associer l'étude d'autres types de cellules progénitrices, d'amas cellulaires les contenant ou le dosage de cytokines pressenties comme à l'origine de la mobilisation des CD34+ (par exemple le SDF1). Par ailleurs, nous avons constitué lors de l'étude DYVA une banque d'ARN sanguins totaux, dont l'exploitation va être maintenant envisagée à la lumière des résultats précédents.

Notre seconde étude a montré un profil de coagulation spécifique chez les enfants drépanocytaires avec des céphalées récurrentes et notamment avec migraine. Elle soulève la question de la signification clinique de ces céphalées en montrant que l'hypothèse d'épisodes répétés d'ischémie cérébrale ultra-transitoire est tout à fait envisageable chez ces enfants. Les céphalées pourraient donc être considérées comme un marqueur d'événements neurovasculaires transitoires. Ces résultats sont confortés par ceux récemment publiés de l'étude SIT (159), discutés plus haut, et qui montraient que les céphalées étaient un marqueur du risque d'infarctus silencieux. Ceci oriente vers les atteintes de la microcirculation cérébrale, qui sont encore relativement peu étudiées dans la drépanocytose, mais dont le rôle est probablement sous-estimé (165). Nous avons participé à l'élaboration d'un projet de recherche, qui a reçu un financement par

le GREX (Groupement de recherche d'Excellence sur le Globule Rouge) et qui va débuter en 2015, visant à explorer la microcirculation cérébrale chez des enfants drépanocytaires selon plusieurs modalités : imagerie par résonance magnétique classique (IRM), imagerie de perfusion en IRM (séquence ASL arterial spin labeling), mesure de saturation dans les capillaires cérébraux au moyen de la NIRS (Near InfraRed Spectroscopy) et paramètres hémorhéologiques biologiques. Il s'agira également d'un projet multidisciplinaire. En préalable, nous avons recueilli quelques données préliminaires sur la perfusion cérébrale chez l'enfant drépanocytaire en ASL, qui sont en cours d'exploitation.

Par ailleurs, nous observons également des accès céphalalgiques et des équivalents migraineux dans une autre artériopathie cérébrale chronique de l'enfant, le moyamoya. En parallèle de l'étude DYVA, nous avons inclus quelques enfants non drépanocytaires avec maladie ou syndrome de moyamoya, que nous avons prélevés avant et après leur chirurgie de revascularisation cérébrale. Nous complétons actuellement le recrutement de ces enfants, afin de disposer d'un nombre suffisants de données pour permettre une analyse statistique. L'objectif est d'étudier chez ces enfants le profil de coagulation et les marqueurs d'activation endothéliale et cellulaire.

Enfin, nous avons montré que le risque hémorragique cérébral reste proportionnellement non modifié par rapport au risque ischémique, même si la prévalence de ce dernier a diminué en valeur absolue. Cela suggère que les stratégies reposant sur le DTC et les programmes transfusionnels ont également un effet sur l'atteinte vasculaire cérébrale prédisposant aux risques hémorragiques, i.e. chez l'enfant les anévrismes chez l'enfant (puisque le moyamoya est très peu hémorragique à cet âge). Nous avons également montré une prévalence des anévrismes intracrâniens plus élevée chez les enfants drépanocytaires que dans la population pédiatrique générale, avec des caractéristiques spécifiques. Cela justifie de réfléchir à la modification de nos habitudes de surveillance de ces enfants. En effet, si aujourd'hui l'IRM cérébrale ne fait pas partie des examens recommandés pour la surveillance des enfants drépanocytaires, qui se fait par le DTC annuel, de nombreux spécialistes souhaitent l'intégrer dans l'arsenal de surveillance chez ces enfants. L'idée initiale était la surveillance des infarctus silencieux, non prédits efficacement par le DTC et de conséquences potentiellement graves, et donc la réalisation d'une IRM cérébrale de manière systématique à partir de l'âge de 5-6 ans (pas de nécessité d'anesthésie ou sédation) selon une périodicité à définir. A cette analyse du parenchyme cérébral, il nous semble important d'ajouter dans le même examen une analyse précise du polygone de Willis, recherchant bien sûr les sténoses artérielles intracrâniennes mais aussi la possible présence d'un ou plusieurs

anévrismes. La discussion thérapeutique autour de ces anévrismes reste ouverte et il est important de colliger les cas, qui restent en faible nombre pour chaque équipe. Nous avons donc participé à une étude collaborative adultes-enfants permettant de colliger ces observations d'anévrismes intracrâniens chez des patients drépanocytaires, dont l'analyse des résultats est en cours.

Annexe 1 : grille de recueil de données cliniques de l'étude DYVA

Recherche de marqueurs associés à la vasculopathie cérébrale chez l'enfant drépanocytaire : approche physiopathologique

Données de l'examen clinique

Date

NOM.....

Prénom

.....

Date de naissance / /

Sexe M F

Age au moment de l'examenansmois

Drépano SS S β ^o

Antécédents vasculaires familiaux :

chez quel apparenté ?

Infarctus cérébral symptomatique / silencieux

Hémorragie cérébrale

Thrombose veineuse cérébrale

Accident ischémique transitoire (AIT)

HTA

Infarctus du myocarde

Syndrome coronarien, cardiopathie ischémique

Thrombose veineuse profonde, embolie pulmonaire

Autres

Antécédents vasculaires personnels :

en quelle année ?

Infarctus cérébral symptomatique / silencieux

Hémorragie cérébrale

Thrombose veineuse cérébrale

Accident ischémique transitoire (AIT)

HTA

Infarctus du myocarde

Syndrome coronarien, cardiopathie ischémique

Thrombose veineuse profonde, embolie pulmonaire

Autres

Histoire de la drépanocytose :

CVO : moins de 5 5-10 >10 >20

Syndrome thoracique aigu : 0 1-2 >3

Séquestration splénique : 01-2 >3

Priapisme : oui non

Dernière complication aiguë = il y a

Traitements en cours :

Hydroxyurée : oui non

depuis.....car.....

Programme transfusionnel : non terminé prévu en cours

Doppler transcrânien :

Examen précédent : date

Résultat : normal conditionnel pathologique ininterprétable

IRM cérébrale :

Examen précédent : date.....

Résultat

.....

Niveau scolaire :

Non scolarisé

Scolarisé : classe (soit/ classe attendue..)

Evaluation (neuro)psycho récente

Difficultés rencontrées

.....

Céphalées récurrentes : oui non

Sémiologie de migraine ? oui non

Antécédents familiaux

céphalalgiques ?.....

Examen clinique :

Latéralité

SpO2 =

%

PC= (.....DS) P = T =
 FC..... (.....DS) TA(.....DS)
 Marche normale oui non Déficit moteur D G MS MI
 Spasticité oui non
 ROT normaux exagérés extension zone réflexogène asymétriques D < >
 G non retrouvés
 Réflexes cutanés plantaires D..... G.....
 Proprioception normale anormale
 Praxies.....
 Motricité fine : écriture Dessin.....
 Encastrements
 Dystonie oui non
 Eléments cérébelleux oui non
 Paires crâniennes : oculomotricité.....paralysie faciale oui non
 Troubles de déglutition : oui non
 Port de verres correcteurs oui non motif.....

Score de Rankin (entourer le chiffre correspondant) : ce jour

0 Aucun symptôme neurologique

1 Symptômes neurologiques n'entraînant pas d'incapacité, peut réaliser ses activités et tâches habituelles

2 Handicap léger, ne peut pas réaliser toutes les activités précédemment citées, mais autonome

3 Handicap modéré, besoin d'aide mais marche possible sans assistance

4 Handicap modéré à sévère, marche et gestes quotidiens impossibles sans aide

5 Handicap sévère, grabataire, incontinent, nécessite des soins et une présence constants

6 Décédé

Références

1. Roach ES, Golomb MR, Adams R, Biller J, Daniels S, Deveber G, et al. Management of stroke in infants and children: a scientific statement from a Special Writing Group of the American Heart Association Stroke Council and the Council on Cardiovascular Disease in the Young. *Stroke J Cereb Circ.* 2008;39(9):2644-91.
2. Amlie-Lefond C, Sébire G, Fullerton HJ. Recent developments in childhood arterial ischaemic stroke. *Lancet Neurol.* 2008;7(5):425-35.
3. Adams R, McKie V, Nichols F, Carl E, Zhang DL, McKie K, et al. The use of transcranial ultrasonography to predict stroke in sickle cell disease. *N Engl J Med.* 1992;326(9):605-10.
4. Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med.* 1998;339(1):5-11.
5. Hankins JS, Fortner GL, McCarville MB, Smeltzer MP, Wang WC, Li C-S, et al. The natural history of conditional transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol.* 2008;142(1):94-9.
6. Adams RJ, McKie VC, Brambilla D, Carl E, Gallagher D, Nichols FT, et al. Stroke prevention trial in sickle cell anemia. *Control Clin Trials.* 1998;19(1):110-29.
7. Bulas D. Screening children for sickle cell vasculopathy: guidelines for transcranial Doppler evaluation. *Pediatr Radiol.* 2005;35(3):235-41.
8. Seibert JJ, Glasier CM, Kirby RS, Allison JW, James CA, Becton DL, et al. Transcranial Doppler, MRA, and MRI as a screening examination for cerebrovascular disease in patients with sickle cell anemia: an 8-year study. *Pediatr Radiol.* 1998;28(3):138-42.
9. Brambilla DJ, Miller ST, Adams RJ. Intra-individual variation in blood flow velocities in cerebral arteries of children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49(3):318-22.
10. Adams RJ, Brambilla DJ, Granger S, Gallagher D, Vichinsky E, Abboud MR, et al. Stroke and conversion to high risk in children screened with transcranial Doppler ultrasound during the STOP study. *Blood.* 2004;103(10):3689-94.
11. Merkel KH, Ginsberg PL, Parker JC, Post MJ. Cerebrovascular disease in sickle cell anemia: a clinical, pathological and radiological correlation. *Stroke J Cereb Circ.* 1978;9(1):45-52.
12. Platt OS. Preventing stroke in sickle cell anemia. *N Engl J Med.* 2005;353(26):2743-5.
13. Hoppe C, Kuypers F, Larkin S, Hagar W, Vichinsky E, Styles L. A pilot study of the short-term use of simvastatin in sickle cell disease: effects on markers of vascular dysfunction. *Br J Haematol.* 2011;153(5):655-63.
14. Pegelow CH, Wang W, Granger S, Hsu LL, Vichinsky E, Moser FG, et al. Silent infarcts in children with sickle cell anemia and abnormal cerebral artery velocity. *Arch Neurol.* 2001;58(12):2017-21.

15. Kato GJ, Onyekwere OC, Gladwin MT. Pulmonary hypertension in sickle cell disease: relevance to children. *Pediatr Hematol Oncol.* 2007;24(3):159-70.
16. Gavins FNE, Russell J, Senchenkova EL, De Almeida Paula L, Damazo AS, Esmon CT, et al. Mechanisms of enhanced thrombus formation in cerebral microvessels of mice expressing hemoglobin-S. *Blood.* 2011;117(15):4125-33.
17. Becton LJ, Kalpatthi RV, Rackoff E, Disco D, Orak JK, Jackson SM, et al. Prevalence and clinical correlates of microalbuminuria in children with sickle cell disease. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2010;25(8):1505-11.
18. Colombatti R, De Bon E, Bertomoro A, Casonato A, Pontara E, Omenetto E, et al. Coagulation activation in children with sickle cell disease is associated with cerebral small vessel vasculopathy. *PloS One.* 2013;8(10):e78801.
19. Deane CR, Goss D, Bartram J, Pohl KRE, Height SE, Sibtain N, et al. Extracranial internal carotid arterial disease in children with sickle cell anemia. *Haematologica.* 2010;95(8):1287-92.
20. Abboud MR, Cure J, Granger S, Gallagher D, Hsu L, Wang W, et al. Magnetic resonance angiography in children with sickle cell disease and abnormal transcranial Doppler ultrasonography findings enrolled in the STOP study. *Blood.* 2004;103(7):2822-6.
21. Silva GS, Vicari P, Figueiredo MS, Carrete H, Idagawa MH, Massaro AR. Brain magnetic resonance imaging abnormalities in adult patients with sickle cell disease: correlation with transcranial Doppler findings. *Stroke J Cereb Circ.* 2009;40(7):2408-12.
22. Kwiatkowski JL, Zimmerman RA, Pollock AN, Seto W, Smith-Whitley K, Shults J, et al. Silent infarcts in young children with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2009;146(3):300-5.
23. Miller ST, Wright E, Abboud M, Berman B, Files B, Scher CD, et al. Impact of chronic transfusion on incidence of pain and acute chest syndrome during the Stroke Prevention Trial (STOP) in sickle-cell anemia. *J Pediatr.* 2001;139(6):785-9.
24. Kato GJ, Hsieh M, Machado R, Taylor J, Little J, Butman JA, et al. Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. *Am J Hematol.* 2006;81(7):503-10.
25. Pashankar FD, Carbonella J, Bazzi-Asaad A, Friedman A. Prevalence and risk factors of elevated pulmonary artery pressures in children with sickle cell disease. *Pediatrics.* 2008;121(4):777-82.
26. Wigfall DR, Ware RE, Burchinal MR, Kinney TR, Foreman JW. Prevalence and clinical correlates of glomerulopathy in children with sickle cell disease. *J Pediatr.* 2000;136(6):749-53.
27. Becker AM. Sickle cell nephropathy: challenging the conventional wisdom. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2011;26(12):2099-109.
28. Maier-Redelsperger M, Lévy P, Lionnet F, Stankovic K, Haymann J-P, Lefèvre G, et al. Strong association between a new marker of hemolysis and glomerulopathy in sickle cell anemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2010;45(4):289-92.
29. Ataga KI, Brittain JE, Moore D, Jones SK, Hulkower B, Strayhorn D, et al. Urinary albumin excretion is associated with pulmonary hypertension in sickle cell disease: potential role of soluble fms-like tyrosine kinase-1. *Eur J Haematol.* 2010;85(3):257-63.

30. Ware RE, Schultz WH, Yovetich N, Mortier NA, Alvarez O, Hilliard L, et al. Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea (SWITCH): a phase III randomized clinical trial for treatment of children with sickle cell anemia, stroke, and iron overload. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57(6):1011-7.
31. Platt OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 2008;358(13):1362-9.
32. Colella MP, De Paula EV, Conran N, Machado-Neto JA, Annicchino-Bizzacchi JM, Costa FF, et al. Hydroxyurea is associated with reductions in hypercoagulability markers in sickle cell anemia. *J Thromb Haemost JTH*. 2012;10(9):1967-70.
33. Proença-Ferreira R, Franco-Penteado CF, Traina F, Saad STO, Costa FF, Conran N. Increased adhesive properties of platelets in sickle cell disease: roles for α IIb β 3-mediated ligand binding, diminished cAMP signalling and increased phosphodiesterase 3A activity. *Br J Haematol*. 2010;149(2):280-8.
34. Ulug P, Vasavda N, Kumar R, Keir L, Awogbade M, Cunningham J, et al. Hydroxyurea therapy lowers circulating DNA levels in sickle cell anemia. *Am J Hematol*. 2008;83(9):714-6.
35. Quinn CT, Variste J, Dowling MM. Haemoglobin oxygen saturation is a determinant of cerebral artery blood flow velocity in children with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 2009;145(4):500-5.
36. Zimmerman SA, Schultz WH, Burgett S, Mortier NA, Ware RE. Hydroxyurea therapy lowers transcranial Doppler flow velocities in children with sickle cell anemia. *Blood*. 2007;110(3):1043-7.
37. Ware RE, Helms RW, SWITCH Investigators. Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea (SWITCH). *Blood*. 2012;119(17):3925-32.
38. Kossorotoff M, Grevent D, de Montalembert M. [Cerebral vasculopathy in pediatric sickle-cell anemia]. *Arch Pédiatrie Organe Off Société Fr Pédiatrie*. 2014;21(4):404-14.
39. O'Driscoll S, Height SE, Dick MC, Rees DC. Serum lactate dehydrogenase activity as a biomarker in children with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2008;140(2):206-9.
40. Bernaudin F, Verlhac S, Chevret S, Torres M, Coic L, Arnaud C, et al. G6PD deficiency, absence of alpha-thalassemia, and hemolytic rate at baseline are significant independent risk factors for abnormally high cerebral velocities in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2008;112(10):4314-7.
41. Meier ER, Wright EC, Miller JL. Reticulocytosis and anemia are associated with an increased risk of death and stroke in the newborn cohort of the Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Am J Hematol*. 2014;89(9):904-6.
42. Silva CM, Giovani P, Viana MB. High reticulocyte count is an independent risk factor for cerebrovascular disease in children with sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56(1):116-21.
43. Rees DC, Dick MC, Height SE, O'Driscoll S, Pohl KRE, Goss DE, et al. A simple index using age, hemoglobin, and aspartate transaminase predicts increased intracerebral blood velocity as measured by transcranial Doppler scanning in children with sickle cell anemia. *Pediatrics*. 2008;121(6):e1628-32.
44. Setty BNY, Kulkarni S, Stuart MJ. Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion. *Blood*. 2002;99(5):1564-71.

45. Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS. Impaired vasodilation by red blood cells in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(7):2531-6.
46. Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor J, Morris CR, et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2006;107(6):2279-85.
47. Morris CR. Mechanisms of vasculopathy in sickle cell disease and thalassemia. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2008;177-85.
48. Van Beers EJ, Schaap MCL, Berckmans RJ, Nieuwland R, Sturk A, van Doormaal FF, et al. Circulating erythrocyte-derived microparticles are associated with coagulation activation in sickle cell disease. *Haematologica*. 2009;94(11):1513-9.
49. Ras RT, Streppel MT, Draijer R, Zock PL. Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: a systematic review with meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2013;168(1):344-51.
50. Urbina EM, Williams RV, Alpert BS, Collins RT, Daniels SR, Hayman L, et al. Noninvasive assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents: recommendations for standard assessment for clinical research: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension*. 2009;54(5):919-50.
51. Blum A, Yeganeh S, Peleg A, Vigder F, Kryuger K, Khatib A, et al. Endothelial function in patients with sickle cell anemia during and after sickle cell crises. *J Thromb Thrombolysis*. 2005;19(2):83-6.
52. De Montalembert M, Aggoun Y, Niakate A, Szezepanski I, Bonnet D. Endothelial-dependent vasodilation is impaired in children with sickle cell disease. *Haematologica*. 2007;92(12):1709-10.
53. Eberhardt RT, McMahon L, Duffy SJ, Steinberg MH, Perrine SP, Loscalzo J, et al. Sickle cell anemia is associated with reduced nitric oxide bioactivity in peripheral conduit and resistance vessels. *Am J Hematol*. 2003;74(2):104-11.
54. Sivamurthy KM, Dampier C, MacDermott M, Maureen M, Cahill M, Hsu LL. Peripheral arterial tonometry in assessing endothelial dysfunction in pediatric sickle cell disease. *Pediatr Hematol Oncol*. 2009;26(8):589-96.
55. Belizna C, Loufrani L, Ghali A, Lahary A, Primard E, Louvel J-P, et al. Arterial stiffness and stroke in sickle cell disease. *Stroke J Cereb Circ*. 2012;43(4):1129-30.
56. Van den Oord SCH, Sijbrands EJG, ten Kate GL, van Klaveren D, van Domburg RT, van der Steen AFW, et al. Carotid intima-media thickness for cardiovascular risk assessment: systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2013;228(1):1-11.
57. Patel RK, Ford E, Thumpston J, Arya R. Risk factors for venous thrombosis in the black population. *Thromb Haemost*. 2003;90(5):835-8.
58. O'Donnell J, Laffan MA. The relationship between ABO histo-blood group, factor VIII and von Willebrand factor. *Transfus Med Oxf Engl*. 2001;11(4):343-51.
59. Conlan MG, Folsom AR, Finch A, Davis CE, Sorlie P, Marcucci G, et al. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Haemost*. 1993;70(3):380-5.

60. Jerrard-Dunne P, Evans A, McGovern R, Hajat C, Kalra L, Rudd AG, et al. Ethnic differences in markers of thrombophilia: implications for the investigation of ischemic stroke in multiethnic populations: the South London Ethnicity and Stroke Study. *Stroke J Cereb Circ.* 2003;34(8):1821-6.
61. Leslie J, Langler D, Serjeant GR, Serjeant BE, Desai P, Gordon YB. Coagulation changes during the steady state in homozygous sickle-cell disease in Jamaica. *Br J Haematol.* 1975;30(2):159-66.
62. Ataga KI, Orringer EP. Hypercoagulability in sickle cell disease: a curious paradox. *Am J Med.* 2003;115(9):721-8.
63. Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, Jones S, Whinna HC, Strayhorn D, et al. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica.* 2008;93(1):20-6.
64. Mohan JS, Lip GY, Wright J, Bareford D, Blann AD. Plasma levels of tissue factor and soluble E-selectin in sickle cell disease: relationship to genotype and to inflammation. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb.* 2005;16(3):209-14.
65. Chen J, Hobbs WE, Le J, Lenting PJ, de Groot PG, López JA. The rate of hemolysis in sickle cell disease correlates with the quantity of active von Willebrand factor in the plasma. *Blood.* 2011;117(13):3680-3.
66. Noubouossie DCF, Lê PQ, Rozen L, Ziereisen F, Willems D, Demulder A, et al. Thrombin generation in children with sickle cell disease: relationship with age, hemolysis, transcranial Doppler velocity, and hydroxyurea treatment. *Eur J Haematol.* 2013;91(1):46-54.
67. Ataga KI, Brittain JE, Desai P, May R, Jones S, Delaney J, et al. Association of coagulation activation with clinical complications in sickle cell disease. *PloS One.* 2012;7(1):e29786.
68. Kurantsin-Mills J, Ofosu FA, Safa TK, Siegel RS, Lessin LS. Plasma factor VII and thrombin-antithrombin III levels indicate increased tissue factor activity in sickle cell patients. *Br J Haematol.* 1992;81(4):539-44.
69. Liesner R, Mackie I, Cookson J, McDonald S, Chitolie A, Donohoe S, et al. Prothrombotic changes in children with sickle cell disease: relationships to cerebrovascular disease and transfusion. *Br J Haematol.* 1998;103(4):1037-44.
70. Holy EW, Tanner FC. Tissue factor in cardiovascular disease pathophysiology and pharmacological intervention. *Adv Pharmacol San Diego Calif.* 2010;59:259-92.
71. Key NS, Slungaard A, Dandele L, Nelson SC, Moertel C, Styles LA, et al. Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. *Blood.* 1998;91(11):4216-23.
72. Chantrathammachart P, Mackman N, Sparkenbaugh E, Wang J-G, Parise LV, Kirchhofer D, et al. Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. *Blood.* 2012;120(3):636-46.
73. Proença-Ferreira R, Brugnerotto AF, Garrido VT, Dominical VM, Vital DM, Ribeiro M de FR, et al. Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. *PloS One.* 2014;9(2):e89012.
74. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med.* 1994;330(23):1639-44.

75. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1998;91(1):288-94.
76. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: a new paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):3047-51.
77. Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, de Gaetano G. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res*. 2012;129(3):263-6.
78. Wun T, Cordoba M, Rangaswami A, Cheung AW, Paglieroni T. Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clin Lab Haematol*. 2002;24(2):81-8.
79. Polanowska-Grabowska R, Wallace K, Field JJ, Chen L, Marshall MA, Figler R, et al. P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2392-9.
80. Gardiner EE, Andrews RK. Neutrophil extracellular traps (NETs) and infection-related vascular dysfunction. *Blood Rev*. 2012;26(6):255-9.
81. Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lämmle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood*. 2012;120(6):1157-64.
82. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(8):1777-83.
83. Schimmel M, Nur E, Biemond BJ, van Mierlo GJ, Solati S, Brandjes DP, et al. Nucleosomes and neutrophil activation in sickle cell disease painful crisis. *Haematologica*. 2013;98(11):1797-803.
84. Chen G, Zhang D, Fuchs TA, Manwani D, Wagner DD, Frenette PS. Heme-induced neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of sickle cell disease. *Blood*. 2014;123(24):3818-27.
85. Smadja DM, Gaussem P, Mauge L, Israël-Biet D, Dignat-George F, Peyrard S, et al. Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to congenital heart disease. *Circulation*. 2009;119(3):374-81.
86. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1997;337(22):1584-90.
87. Strijbos MH, Landburg PP, Nur E, Teerlink T, Leebeek FWG, Rijnveld AW, et al. Circulating endothelial cells: a potential parameter of organ damage in sickle cell anemia? *Blood Cells Mol Dis*. 2009;43(1):63-7.
88. Huang S-H, Wang L, Chi F, Wu C-H, Cao H, Zhang A, et al. Circulating brain microvascular endothelial cells (cBMECs) as potential biomarkers of the blood-brain barrier disorders caused by microbial and non-microbial factors. *PLoS One*. 2013;8(4):e62164.
89. Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: a novel marker of endothelial damage. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2006;373(1-2):17-26.
90. Van Beem RT, Nur E, Zwaginga JJ, Landburg PP, van Beers EJ, Duits AJ, et al. Elevated endothelial progenitor cells during painful sickle cell crisis. *Exp Hematol*. 2009;37(9):1054-9.

91. Rodrigo M, Mendelsohn L, Bereal-Williams C, Hunter L, Dalby CK, McGowan V, et al. Circulating endothelial progenitor cells in adults with sickle cell disease. *Pulm Circ.* 2013;3(2):448-9.
92. Anjum F, Lazar J, Zein J, Jamaledine G, Demetis S, Wadgaonkar R. Characterization of altered patterns of endothelial progenitor cells in sickle cell disease related pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 2012;2(1):54-60.
93. Wun T, Styles L, DeCastro L, Telen MJ, Kuypers F, Cheung A, et al. Phase 1 study of the E-selectin inhibitor GMI 1070 in patients with sickle cell anemia. *PloS One.* 2014;9(7):e101301.
94. Kutlar A, Ataga KI, McMahon L, Howard J, Galacteros F, Hagar W, et al. A potent oral P-selectin blocking agent improves microcirculatory blood flow and a marker of endothelial cell injury in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2012;87(5):536-9.
95. Wood KC, Hebbel RP, Granger DN. Endothelial cell P-selectin mediates a proinflammatory and prothrombotic phenotype in cerebral venules of sickle cell transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(5):H1608-14.
96. Chang J, Patton JT, Sarkar A, Ernst B, Magnani JL, Frenette PS. GMI-1070, a novel pan-selectin antagonist, reverses acute vascular occlusions in sickle cell mice. *Blood.* 2010;116(10):1779-86.
97. Kato GJ, Martyr S, Blackwelder WC, Nichols JS, Coles WA, Hunter LA, et al. Levels of soluble endothelium-derived adhesion molecules in patients with sickle cell disease are associated with pulmonary hypertension, organ dysfunction, and mortality. *Br J Haematol.* 2005;130(6):943-53.
98. Perelman N, Selvaraj SK, Batra S, Luck LR, Erdreich-Epstein A, Coates TD, et al. Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. *Blood.* 2003;102(4):1506-14.
99. Brittain JE, Hulkower B, Jones SK, Strayhorn D, De Castro L, Telen MJ, et al. Placenta growth factor in sickle cell disease: association with hemolysis and inflammation. *Blood.* 2010;115(10):2014-20.
100. Sarray S, Mahdi N, Saleh LR, Almaoui WY. Reduction in serum IL-10 levels is a surrogate marker for predicting vaso-occlusive crisis in sickle cell disease. *Am J Hematol.* 2014;89(7):789-90.
101. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev.* 2007;21(3):157-71.
102. Ayers L, Kohler M, Harrison P, Sargent I, Dragovic R, Schaap M, et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb Res.* 2011;127(4):370-7.
103. Morel O, Jesel L, Freyssinet J-M, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(1):15-26.
104. Jung K-H, Chu K, Lee S-T, Park H-K, Bahn J-J, Kim D-H, et al. Circulating endothelial microparticles as a marker of cerebrovascular disease. *Ann Neurol.* 2009;66(2):191-9.
105. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, et al. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood.* 2003;102(7):2678-83.

106. Kasar M, Boğa C, Yeral M, Asma S, Kozanoglu I, Ozdogu H. Clinical significance of circulating blood and endothelial cell microparticles in sickle-cell disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2014;38(2):167-75.
107. Sparkenbaugh E, Pawlinski R. Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2013;162(1):3-14.
108. Mehta P, Mehta J. Circulating platelet aggregates in sickle cell disease patients with and without vaso-occlusion. *Stroke J Cereb Circ*. 1979;10(4):464-6.
109. Shah N, Thornburg C, Telen MJ, Ortel TL. Characterization of the hypercoagulable state in patients with sickle cell disease. *Thromb Res*. 2012;130(5):e241-5.
110. Novelli EM, Kato GJ, Ragni MV, Zhang Y, Hildesheim ME, Nouraie M, et al. Plasma thrombospondin-1 is increased during acute sickle cell vaso-occlusive events and associated with acute chest syndrome, hydroxyurea therapy, and lower hemolytic rates. *Am J Hematol*. 2012;87(3):326-30.
111. Hagag AA, Elmashad G, Abd El-Lateef AE. Clinical significance of assessment of thrombospondin and placenta growth factor levels in patients with sickle cell anemia: two centers egyptian studies. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6(1):e2014044.
112. Landburg PP, Elsenga H, Schnog JB, Duits AJ, CURAMA Study Group. Increased serum levels of anti-angiogenic factors soluble fms-like tyrosine kinase and soluble endoglin in sickle cell disease. *Acta Haematol*. 2008;120(3):130-3.
113. Duits AJ, Rodriguez T, Schnog J-JB, CURAMA Study Group. Serum levels of angiogenic factors indicate a pro-angiogenic state in adults with sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2006;134(1):116-9.
114. Smadja DM, Bièche I, Uzan G, Bompais H, Muller L, Boisson-Vidal C, et al. PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(11):2321-7.
115. Martin K, Weiss S, Metharom P, Schmeckpeper J, Hynes B, O'Sullivan J, et al. Thrombin stimulates smooth muscle cell differentiation from peripheral blood mononuclear cells via protease-activated receptor-1, RhoA, and myocardin. *Circ Res*. 2009;105(3):214-8.
116. Gavins F, Yilmaz G, Granger DN. The evolving paradigm for blood cell-endothelial cell interactions in the cerebral microcirculation. *Microcirc*. 2007;14(7):667-81.
117. Raffini LJ, Niebanck AE, Hrusovsky J, Stevens A, Blackwood-Chirchir A, Ohene-Frempong K, et al. Prolongation of the prothrombin time and activated partial thromboplastin time in children with sickle cell disease. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;47(5):589-93.
118. Nsiri B, Gritli N, Bayoudh F, Messaoud T, Fattoum S, Machghoul S. Abnormalities of coagulation and fibrinolysis in homozygous sickle cell disease. *Hematol Cell Ther*. 1996;38(3):279-84.
119. Setty BNY, Key NS, Rao AK, Gayen-Betal S, Krishnan S, Dampier CD, et al. Tissue factor-positive monocytes in children with sickle cell disease: correlation with biomarkers of haemolysis. *Br J Haematol*. 2012;157(3):370-80.
120. Frelinger AL, Jakubowski JA, Brooks JK, Carmichael SL, Berny-Lang MA, Barnard MR, et al. Platelet Activation and Inhibition in Sickle cell disease (PAINS) study. *Platelets*. 2014;25(1):27-35.

121. Inwald DP, Kirkham FJ, Peters MJ, Lane R, Wade A, Evans JP, et al. Platelet and leucocyte activation in childhood sickle cell disease: association with nocturnal hypoxaemia. *Br J Haematol*. 2000;111(2):474-81.
122. Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood*. 2000;96(7):2451-9.
123. Majumdar S, Webb S, Norcross E, Mannam V, Ahmad N, Lirette S, et al. Stroke with intracranial stenosis is associated with increased platelet activation in sickle cell anemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(7):1192-7.
124. Hyacinth HI, Adams RJ, Voeks JH, Hibbert JM, Gee BE. Frequent red cell transfusions reduced vascular endothelial activation and thrombogenicity in children with sickle cell anemia and high stroke risk. *Am J Hematol*. 2014;89(1):47-51.
125. Eleftheriou D, Ganesan V, Hong Y, Klein NJ, Brogan PA. Endothelial injury in childhood stroke with cerebral arteriopathy: a cross-sectional study. *Neurology*. 2012;79(21):2089-96.
126. Hyacinth HI, Gee BE, Adamkiewicz TV, Adams RJ, Kutlar A, Stiles JK, et al. Plasma BDNF and PDGF-AA levels are associated with high TCD velocity and stroke in children with sickle cell anemia. *Cytokine*. 2012;60(1):302-8.
127. Asare K, Gee BE, Stiles JK, Wilson NO, Driss A, Quarshie A, et al. Plasma interleukin-1beta concentration is associated with stroke in sickle cell disease. *Cytokine*. 2010;49(1):39-44.
128. Roberts L, O'Driscoll S, Dick MC, Height SE, Deane C, Goss DE, et al. Stroke prevention in the young child with sickle cell anaemia. *Ann Hematol*. 2009;88(10):943-6.
129. Rivard GE, Brummel-Ziedins KE, Mann KG, Fan L, Hofer A, Cohen E. Evaluation of the profile of thrombin generation during the process of whole blood clotting as assessed by thrombelastography. *J Thromb Haemost JTH*. 2005;3(9):2039-43.
130. Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhoury K, Bouriche T, Judicone C, et al. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(4):1054-8.
131. Bernaudin F, Verlhac S, Arnaud C, Kamdem A, Chevret S, Hau I, et al. Impact of early transcranial Doppler screening and intensive therapy on cerebral vasculopathy outcome in a newborn sickle cell anemia cohort. *Blood*. 2011;117(4):1130-40; quiz 1436.
132. Patel SD, Humphries J, Mattock K, Wadoodi A, Modarai B, Ahmad A, et al. Hematopoietic progenitor cells and restenosis after carotid endarterectomy. *Stroke J Cereb Circ*. 2012;43(6):1663-5.
133. Silberstein S, Loder E, Diamond S, Reed ML, Bigal ME, Lipton RB, et al. Probable migraine in the United States: results of the American Migraine Prevalence and Prevention (AMPP) study. *Cephalalgia Int J Headache*. 2007;27(3):220-9.
134. Plesh O, Adams SH, Gansky SA. Self-reported comorbid pains in severe headaches or migraines in a US national sample. *Headache*. 2012;52(6):946-56.
135. Lip PZY, Lip GYH. Patent foramen ovale and migraine attacks: a systematic review. *Am J Med*. 2014;127(5):411-20.

136. Bellini B, Arruda M, Cescut A, Saulle C, Persico A, Carotenuto M, et al. Headache and comorbidity in children and adolescents. *J Headache Pain*. 2013;14:79.
137. Wöber-Bingöl C. Epidemiology of migraine and headache in children and adolescents. *Curr Pain Headache Rep*. 2013;17(6):341.
138. Niebanck AE, Pollock AN, Smith-Whitley K, Raffini LJ, Zimmerman RA, Ohene-Frempong K, et al. Headache in children with sickle cell disease: prevalence and associated factors. *J Pediatr*. 2007;151(1):67-72, 72.e1.
139. Stewart WF, Lipton RB, Liberman J. Variation in migraine prevalence by race. *Neurology*. 1996;47(1):52-9.
140. Peterlin BL, Rosso AL, Williams MA, Rosenberg JR, Haythornthwaite JA, Merikangas KR, et al. Episodic migraine and obesity and the influence of age, race, and sex. *Neurology*. 2013;81(15):1314-21.
141. Gelaye B, Peterlin BL, Lemma S, Tesfaye M, Berhane Y, Williams MA. Migraine and psychiatric comorbidities among sub-saharan african adults. *Headache*. 2013;53(2):310-21.
142. Halphen I, Elie C, Brousse V, Le Bourgeois M, Allali S, Bonnet D, et al. Severe nocturnal and postexercise hypoxia in children and adolescents with sickle cell disease. *PloS One*. 2014;9(5):e97462.
143. Kaleyias J, Mostofi N, Grant M, Coleman C, Luck L, Dampier C, et al. Severity of obstructive sleep apnea in children with sickle cell disease. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30(9):659-65.
144. Kirkham FJ, Hewes DK, Prengler M, Wade A, Lane R, Evans JP. Nocturnal hypoxaemia and central-nervous-system events in sickle-cell disease. *Lancet*. 2001;357(9269):1656-9.
145. Tripathi A, Jerrell JM, Stallworth JR. Cost-effectiveness of adenotonsillectomy in reducing obstructive sleep apnea, cerebrovascular ischemia, vaso-occlusive pain, and ACS episodes in pediatric sickle cell disease. *Ann Hematol*. 2011;90(2):145-50.
146. Okada Y, Kawamata T, Kawashima A, Yamaguchi K, Ono Y, Hori T. The efficacy of superficial temporal artery-middle cerebral artery anastomosis in patients with moyamoya disease complaining of severe headache. *J Neurosurg*. 2012;116(3):672-9.
147. Cutrer FM. Pathophysiology of migraine. *Semin Neurol*. 2010;30(2):120-30.
148. Dalkara T, Nozari A, Moskowitz MA. Migraine aura pathophysiology: the role of blood vessels and microembolisation. *Lancet Neurol*. 2010;9(3):309-17.
149. Tietjen GE. Migraine as a systemic vasculopathy. *Cephalalgia Int J Headache*. 2009;29(9):987-96.
150. Dowling MM, Noetzel MJ, Rodeghier MJ, Quinn CT, Hirtz DG, Ichord RN, et al. Headache and migraine in children with sickle cell disease are associated with lower hemoglobin and higher pain event rates but not silent cerebral infarction. *J Pediatr*. 2014;164(5):1175-80.e1.
151. Kutai M, Raviv R, Levin C, Hageirat Y, Shalev S, Zalman L, et al. Migraine and hypercoagulability, are they related? A clinical study of thrombophilia in children with migraine. *Br J Haematol*. 2011;152(3):349-51.

152. Ferrara M, Capozzi L, Bertocco F, Ferrara D, Russo R. Thrombophilic gene mutations in children with migraine. *Hematol Amst Neth*. 2012;17(2):115-7.
153. Zeller JA, Lindner V, Frahm K, Baron R, Deuschl G. Platelet activation and platelet-leucocyte interaction in patients with migraine. Subtype differences and influence of triptans. *Cephalalgia Int J Headache*. 2005;25(7):536-41.
154. Tietjen GE, Herial NA, White L, Utley C, Kosmyna JM, Khuder SA. Migraine and biomarkers of endothelial activation in young women. *Stroke J Cereb Circ*. 2009;40(9):2977-82.
155. Oterino A, Toriello M, Palacio E, Quintanilla VG, Ruiz-Lavilla N, Montes S, et al. Analysis of endothelial precursor cells in chronic migraine: a case-control study. *Cephalalgia Int J Headache*. 2013;33(4):236-44.
156. Liman TG, Bachelier-Walenta K, Neeb L, Rosinski J, Reuter U, Böhm M, et al. Circulating endothelial microparticles in female migraineurs with aura. *Cephalalgia Int J Headache*. 2014;
157. Tietjen GE. Circulating microparticles in migraine with aura: Cause or consequence, a link to stroke. *Cephalalgia Int J Headache*. 2014;
158. Akinola NO, Stevens SM, Franklin IM, Nash GB, Stuart J. Subclinical ischaemic episodes during the steady state of sickle cell anaemia. *J Clin Pathol*. 1992;45(10):902-6.
159. DeBaun MR, Gordon M, McKinsty RC, Noetzel MJ, White DA, Sarnaik SA, et al. Controlled trial of transfusions for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 2014;371(8):699-710.
160. Gueguen A, Mahevas M, Nzouakou R, Hosseini H, Habibi A, Bachir D, et al. Sickle-cell disease stroke throughout life: a retrospective study in an adult referral center. *Am J Hematol*. 2014;89(3):267-72.
161. Brandão RACS, de Carvalho GTC, Reis BL, Bahia E, de Souza AA. Intracranial aneurysms in sickle cell patients: report of 2 cases and review of the literature. *Surg Neurol*. 2009;72(3):296-9; discussion 299.
162. Preul MC, Cendes F, Just N, Mohr G. Intracranial aneurysms and sickle cell anemia: multiplicity and propensity for the vertebrobasilar territory. *Neurosurgery*. 1998;42(5):971-7; discussion 977-8.
163. Liaquat I, Murphy M, Bassi S, Bullock PR. Paediatric and adult vascular intracranial complications of sickle-cell disease. *Acta Neurochir (Wien)*. 2010;152(7):1175-9.
164. Oyesiku NM, Barrow DL, Eckman JR, Tindall SC, Colohan AR. Intracranial aneurysms in sickle-cell anemia: clinical features and pathogenesis. *J Neurosurg*. 1991;75(3):356-63.
165. Hulbert ML, Ford AL. Understanding sickle cell brain drain. *Blood*. 2014;124(6):830-1.